

PSOD EXPRESSION UNITS

Publication number: WO2005059144

Publication date: 2005-06-30

Inventor: KROEGER BURKHARD (DE); ZELDER OSKAR (DE); KLOPPROGGE CORINNA (DE); SCHROEDER HARTWIG (DE); HAEFNER STEFAN (DE)

Applicant: BASF AG (DE); KROEGER BURKHARD (DE); ZELDER OSKAR (DE); KLOPPROGGE CORINNA (DE); SCHROEDER HARTWIG (DE); HAEFNER STEFAN (DE)

Classification:

- **International:** C12N9/02; C12N15/77; C12N9/02; C12N15/74; (IPC1-7): C12N15/77; C12N1/21; C12N9/02

- **European:** C12N15/77

Application number: WO2004EP14337 20041216

Priority number(s): DE20031059660 20031218

Also published as:

- EP1697526 (A1)
- EP1697526 (A0)
- DE10359660 (A1)
- CN1894411 (A)
- CA2549171 (A1)

[more >>](#)

Cited documents:

- WO0100804
- EP1108790
- XP002320454
- XP002320459
- XP008006983

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract of WO2005059144

The invention relates to the use of nucleic acid sequences for regulating gene transcription and expression, said novel promoters and expression units, methods for modifying or inducing the gene transcription rate and/or expression rate, expression cassettes containing said expression units, genetically modified microorganisms having a modified or induced transcription rate and/or expression rate, and methods for producing biosynthetic products by cultivating said genetically modified microorganisms.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. Juni 2005 (30.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/059144 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/77, 9/02, 1/21 (74) Gemeinsamer Vertreter: BASF AKTIENGESELLSCHAFT; 67056 Ludwigshafen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/014337

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:
16. Dezember 2004 (16.12.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(30) Angaben zur Priorität:
103 59 660.7 18. Dezember 2003 (18.12.2003) DE

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchenbericht

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BASF AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KRÖGER, Burkhard [DE/DE]; Im Waldhof 1, 67117 Limburgerhof (DE). ZELDER, Oskar [DE/DE]; Franz-Stützel-Str. 8, 67346 Speyer (DE). KLOPPROGGE, Corinna [DE/DE]; Rastatter Str. 10, 68239 Mannheim (DE). SCHRÖDER, Hartwig [DE/DE]; Benzstr. 4, 69226 Nussloch (DE). HAEFNER, Stefan [DE/DE]; Luitpoldstrasse 11, 67063 Ludwigshafen (DE).

A1 (54) Title: PSOD EXPRESSION UNITS

(54) Bezeichnung: PSOD-EXPRESSIONSEINHEITEN

(57) Abstract: The invention relates to the use of nucleic acid sequences for regulating gene transcription and expression, said novel promoters and expression units, methods for modifying or inducing the gene transcription rate and/or expression rate, expression cassettes containing said expression units, genetically modified microorganisms having a modified or induced transcription rate and/or expression rate, and methods for producing biosynthetic products by cultivating said genetically modified microorganisms.

WO 2005/059144 A1 (57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionsskassetten, enthaltend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.

Psod-Expressionseinheiten

Beschreibung

5 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Nukleinsäuresequenzen zur Regulation der Transkription und Expression von Genen, die neuen Promotoren und Expressionseinheiten selbst, Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen, Expressionskassetten, enthaltend die Expressionseinheiten, genetisch veränderte Mikroorganismen mit veränderter 10 oder verursachter Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate sowie Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung der genetisch veränderten Mikroorganismen.

15 Verschiedene biosynthetische Produkte, wie beispielsweise Feinchemikalien, wie unter anderem Aminosäuren, Vitamine aber auch Proteine werden über natürliche Stoffwechselprozesse in Zellen hergestellt und werden in vielen Industriezweigen verwendet, einschließlich der Nahrungsmittel-, Futtermittel-, Kosmetik-, Feed-, Food- und pharmazeutischen Industrie. Diese Substanzen, die zusammen als Feinchemikalien/Proteine bezeichnet werden, umfassen unter anderem organische Säuren, sowohl 20 proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Nukleotide und Nukleoside, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlenhydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, sowie Proteine und Enzyme. Ihre Produktion erfolgt am zweckmäßigsten im Großmaßstab mittels Anzucht von Bakterien, die entwickelt wurden, um große Mengen der jeweils gewünschten Substanz zu produzieren und sezernieren. Für diesen Zweck besonders geeignete Organismen sind coryneforme Bakterien, gram-positive nicht-pathogene Bakterien.

30 Es ist bekannt, dass Aminosäuren durch Fermentation von Stämmen coryneformer Bakterien, insbesondere *Corynebacterium glutamicum*, hergestellt werden. Wegen der großen Bedeutung wird ständig an der Verbesserung der Herstellverfahren gearbeitet. Verfahrensverbesserungen können fermentationstechnische Maßnahmen, wie zum Beispiel Rührung und Versorgung mit Sauerstoff, oder die Zusammensetzung der Nährmedien, wie zum Beispiel die Zuckerkonzentration während der Fermentation, oder die Aufarbeitung zum Produkt, beispielsweise durch Ionenaustauschchromatographie aber auch Sprühwässerung, oder die intrinsischen Leistungseigenschaften 35 des Mikroorganismus selbst betreffen.

40 Seit einigen Jahren werden ebenfalls Methoden der rekombinanten DNA-Technik zur Stammverbesserung von Feinchemikalien/Proteine produzierender Stämme von *Corynebacterium* eingesetzt, indem man einzelne Gene amplifiziert und die Auswirkung auf die Produktion von Feinchemikalien/Proteine untersucht.

Andere Wege, um ein Verfahren für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu entwickeln, oder die Produktivität eines bereits existierenden Verfahrens für die Herstellung Feinchemikalien, Aminosäuren oder Proteine zu erhöhen bzw. zu verbessern, sind die Expression eines oder mehrerer Gene zu erhöhen bzw. zu verändern und/oder die Translation einer mRNA durch geeignete Polynukleotidsequenzen zu beeinflussen. Beeinflussung kann in diesem Zusammenhang die Erhöhung, Verringerung, oder auch andere Parameter der Expression von Genen wie zeitliche Expressionsmuster umfassen.

5 Dem Fachmann sind unterschiedliche Bestandteile von bakteriellen Regulationssequenzen bekannt. Man unterscheidet die Bindungstellen von Regulatoren, auch Operatoren genannt, die Bindungstellen von RNA-Polymerase-Holoenzymen, auch -35 und -10 Regionen genannt, und die Bindungsstelle von Ribosomaler 16S-RNA, auch Ribosomal Bindungsstelle oder auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt.

10 Als Sequenz einer Ribosomalen Bindungsstelle, auch Shine-Dalgarno-Sequenz genannt, im Sinne dieser Erfindung werden Polynukleotidsequenzen verstanden, die sich bis zu 20 Basen stromauf des Initiationskodon der Translation befinden.

15 In der Literatur (*E. coli* und *S. typhimurium*, Neidhardt F.C. 1995 ASM Press) wird beschrieben, dass sowohl die Zusammensetzung der Polynukletidsequenz der Shine-Dalgarno-Sequenz, die Sequenzabfolge der Basen, aber auch der Abstand einer in der Shine-Dalgarno-Sequenz enthaltenen Polynukletidsequenz zum einen wesentlichen Einfluss auf die Initiationstionsrate der Translation hat.

20 Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität können die Bildung von mRNA auf unterschiedliche Weise beeinflussen. Promotoren, deren Aktivität unabhängig von der physiologischen Wachstumsphase des Organismus sind, nennt man konstitutiv. Wiederum andere Promotoren reagieren auf externe chemische, wie physikalische Stimuli wie Sauerstoff, Metabolite, Hitze, pH, etc.. Wiederum andere zeigen in unterschiedlichen Wachstumsphasen eine starke Abhängigkeit ihrer Aktivität. Beispielsweise sind in der Literatur Promotoren beschrieben, die während der exponentiellen Wachstumsphase von Mikroorganismen eine besonders ausgeprägte Aktivität zeigen, oder aber auch genau in der stationären Phase des mikrobiellen Wachstums. Beide Charakteristika von Promotoren können für eine Produktion von Feinchemikalien und Proteine je nach Stoffwechselweg einen günstigen Einfluss auf die Produktivität haben.

25 Zum Beispiel kann man Promotoren die während des Wachstums die Expression eines Gens ausschalten, diese aber nach einem optimalen Wachstum anschalten dazu nutzen, ein Gen zu regulieren, das die Produktion eines Metaboliten kontrolliert. Der

30

35

40

veränderte Stamm weist dann die gleichen Wachstumsparameter wie der Ausgangsstamm auf, produziert aber mehr Produkt pro Zelle. Diese Art der Modifizierung kann sowohl den Titer (g Produkt/Liter) als auch die C-Ausbeute (g Produkt/g-C-Quelle) erhöhen.

5

In *Corynebacterium* Spezies konnten bereits solche Nukleotidsequenzen isoliert werden, die für eine Erhöhung bzw. eine Abschwächung der Genexpression genutzt werden können. Diese regulierten Promotoren können die Rate, mit der ein Gen transkribiert wird, abhängig von den internen und/oder externen Bedingungen der Zelle erhöhen oder erniedrigen. Zum Teil kann die Anwesenheit eines bestimmten Faktors, bekannt als Inducer, die Rate der Transkription vom Promotor stimulieren. Inducer können direkt oder aber indirekt die Transkription vom Promotor beeinflussen. Eine andere Klasse von Faktoren, bekannt als Suppressoren ist in der Lage, die Transkription vom Promotor zu reduzieren oder aber zu inhibieren. Wie auch die Inducer, können auch die Suppressoren direkt oder indirekt wirken. Es sind jedoch auch Promotoren bekannt, die über die Temperatur reguliert werden. So kann der Level der Transkription solcher Promotoren zum Beispiel durch eine Erhöhung der Wachstumstemperatur über die normale Wachstumstemperatur der Zelle erhöht oder aber abgeschwächt werden.

10 15 20 25 30 35 40

Eine geringe Anzahl von Promotoren aus *C. glutamicum* wurden bis zum heutigen Tag beschrieben. Der Promotor des Malatsynthase-Gens aus *C. glutamicum* wurde im DE 4440118 beschrieben. Dieser Promotor wurde einem für ein Protein kodierendes Strukturen vorgeschaltet. Nach Transformation eines solchen Konstrukts in ein coryneformes Bakterium wird die Expression des dem Promotor nachgeschalteten Strukturen reguliert. Die Expression des Strukturgens wird induziert sobald dem Medium ein entsprechender Induktor zugesetzt wird.

Reinscheid et al., Microbiology 145:503 (1999) haben eine transkriptionelle Fusion zwischen dem pta-ack Promotor aus *C. glutamicum* und einem Reporterogen (Chloramphenicol Acetyltransferase) beschrieben. Zellen von *C. glutamicum*, die eine solche

transkriptionelle Fusion enthalten, wiesen eine erhöhte Expression des Reporterogenes bei Wachstum auf Acetat haltigem Medium auf. Im Vergleich dazu zeigten transformierte Zellen, die auf Glucose wuchsen, keine erhöhte Expression dieses Reporterogens.

35

In Pa'tek et al., Microbiology 142:1297 (1996) wurden einige DNA Sequenzen aus *C. glutamicum* beschrieben, die die Expression eines Reporterogens in *C. glutamicum* Zellen verstärken können, beschrieben. Diese Sequenzen wurden miteinander verglichen, um Consensus-Sequenzen für *C. glutamicum* Promotoren zu definieren.

Weitere DNA-Sequenzen aus *C. glutamicum*, die zur Regulation der Genexpression genutzt werden können, sind im Patent WO 02/40679 beschrieben worden. Diese isolierten Polynukleotide stellen Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* dar, die entweder zur Erhöhung oder aber zur Verringerung einer Genexpression ge-
5 nutzt werden können. Weiterhin sind in diesem Patent rekombinante Plasmide be- schrieben, auf denen die Expressionseinheiten aus *Corynebakterium glutamicum* mit heterologen Genen assoziiert sind. Die hier beschriebenen Methode, Fusion von einem Promotor aus *Corynebakterium glutamicum* mit einem heterologen Gen, kann unter anderem zur Regulation der Gene der Aminosäurebiosynthese eingesetzt werden.

10

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde weitere Promotoren und/oder Expressions- einheiten mit vorteilhaften Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

15

Demgemäß wurde gefunden, dass man Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthal- tend

20

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleo- tiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nuklein- säureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 un- ter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

25

zur Transkription von Genen verwenden kann.

30

Unter „Transkription“ wird erfindungsgemäß der Prozess verstanden, durch den aus- gehend von einer DNA-Matrize ein komplementäres RNA-Molekül hergestellt wird. An diesem Prozess sind Proteine wie die RNA-Polymerase sogenannte Sigma-Faktoren und transkriptionelle Regulatorproteine beteiligt. Die synthetisierte RNA dient dann als Matrize im Prozess der Translation, der dann zum biosynthetisch aktiven Protein führt.

35

Die Bildungsrate, mit der ein biosynthetisch aktives Protein hergestellt wird, ist ein Pro- dukt aus der Rate der Transkription und der Translation. Beide Raten können erfin- dungsgemäß beeinflusst werden und damit die Rate der Bildung von Produkten in ei- nem Mikroorganismus beeinflussen.

Unter einem „Promotor“ oder einer „Nukleinsäure mit Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu transkribierenden Nukleinsäure, die Transkription dieser Nukleinsäure reguliert.

5 Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und einer zu transkribierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel Nukleinsäuresequenzen, die die Transkription von Nukleinsäuren gewährleisten, sowie zum Beispiel einen Terminator

10 derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der Transkription der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die zu transkribierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Promotorsequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Promotorsequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als

15 20 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Unter „Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA, also die Transkriptionsrate verstanden.

25 Unter „spezifischer Promotoraktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch den Promotor gebildete Menge RNA pro Promotor verstanden.

Unter dem Begriff "Wildtyp" wird erfindungsgemäß der entsprechende Ausgangsmikroorganismus verstanden.

30 Je nach Zusammenhang kann unter dem Begriff "Mikroorganismus" der Ausgangsmikroorganismus (Wildtyp) oder ein erfindungsgemäßer, genetisch veränderter Mikroorganismus oder beides verstanden werden.

35 Vorzugsweise und insbesondere in Fällen, in denen der Mikroorganismus oder der Wildtyp nicht eindeutig zugeordnet werden kann, wird unter "Wildtyp" für die Veränderung oder Verursachung der Promotoraktivität oder Trankriptionsrate, für die Veränderung oder Verursachung der Expressionsaktivität oder Expressionsrate und für die Erhöhung des Gehalts an biosynthetischen Produkten jeweils ein Referenzorganismus

verstanden.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist dieser Referenzorganismus Corynebakterium glutamicum ATCC 13032.

5

In einer bevorzugten Ausführungsform werden Ausgangsmikroorganismen verwendet die bereits in der Lage sind, die gewünschte Feinchemikalie herzustellen. Besonders bevorzugt sind dabei unter den besonders bevorzugten Mikroorganismen der Bakterien der Gattung Corynebacterien und den besonders bevorzugten Feinchemikalien L-

10

Lysin, L-Methionin und L-Threonin, diejenigen Ausgangsmikroorganismen die bereits in der Lage sind, L-Lysin, L-Methionin und/oder L-Threonin herzustellen. Dies sind besonderes bevorzugt Corynebakterien bei denen beispielsweise das Gen kodierend für eine Aspartokinase (ask-Gen) dereguliert ist oder die feed-back-Inhibierung aufgehoben oder reduziert ist. Beispielsweise weisen solche Bakterien im ask-Gen eine Mutation auf, die zu einer Reduzierung oder Aufhebung der feed-back-Inhibierung führen, wie beispielsweise die Mutation T311I.

15

Bei einer „verursachten Promotoraktivität“ oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung einer RNA verursacht, die im Wildtyp so nicht vorhanden war.

20

Bei einer veränderten Promotoraktivität oder Transkriptionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge der RNA verändert.

25

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

30

Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Promotoraktivität des endogenen erfindungsgemäßen Promoters, beispielsweise durch Mutation des Promoters oder durch Stimmulierung oder Hemmung des Promoters erfolgen.

35

Weiterhin kann die erhöhte Promotoraktivität oder Transkriptionsrate beispielsweise durch Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität erreicht werden, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

40

Vorzugsweise wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäu-

ren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität dadurch erreicht, dass man

eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthalten

20 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder

B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder

25 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 stellt die Promotorsequenz der Superoxid-
30 Dismutase (Psod) aus Corynebakterium glutamicum dar. SEQ. ID. NO. 1 entspricht der Promotorsequenz des Wildtyps.

Die Erfindung betrifft weiterhin Nukleinsäuren mit Promotoraktivität enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete
35 Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist.

Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Promotoren lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Daten-

banken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 1 leicht auffinden.

Künstliche erfindungsgemäße Promotor-Sequenzen lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 1 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch

5 Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

Unter dem Begriff "Substitution" ist in der Beschreibung der Austausch einer oder mehrerer Nukleotide durch ein oder mehrere Nukleotide zu verstehen. „Deletion“ ist das Ersetzen eines Nukleotides durch eine direkte Bindung. Insertionen sind Einfügungen
10 von Nukleotiden in die Nukleinsäuresequenz, wobei formal eine direkte Bindung durch ein oder mehrere Nukleotide ersetzt wird.

Unter Identität zwischen zwei Nukleinsäuren wird die Identität der Nukleotide über die jeweils gesamte Nukleinsäurelänge verstanden, insbesondere die Identität die durch

15 Vergleich mit Hilfe der Vector NTI Suite 7.1 Software der Firma Informax (USA) unter Anwendung der Clustal Methode (Higgins DG, Sharp PM. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. Comput Appl Biosci. 1989 Apr;5(2):151-1) unter Einstellung folgender Parameter berechnet wird:

20 Multiple alignment parameter:

Gap opening penalty 10

Gap extension penalty 10

Gap separation penalty range 8

Gap separation penalty off

25 % identity for alignment delay 40

Residue specific gaps off

Hydrophilic residue gap off

Transition weighing 0

30 Pairwise alignment parameter:

FAST algorithm on

K-tuplesize 1

Gap penalty 3

Window size 5

35 Number of best diagonals 5

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 1 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, ins-

besondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität von mindestens 90 % aufweist.

Besonders bevorzugte Promotoren weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 5 1 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

Weitere natürliche Beispiele für Promotoren lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der 10 Sequenz SEQ ID NO: 1 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. 15 No. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotide.

20 Die Hybridisierung erfolgt erfinnungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

25 Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (ph7,6), 5x Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte 30 Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität, Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische Promotoraktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

35 Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Promotoraktivität verstanden die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevorzugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Promotoraktivität der Ausgangssequenz aufweist.

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform A), B) oder C) beschriebenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität verstanden. Vorzugsweise weisen diese Fragmente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz

5 SEQ. ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 als Promotor, d.h. zur Transkription von Genen.

10 Die SEQ. ID. NO. 1 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 beschrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen mit Promotoraktivität.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend

15

- A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
- B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
- 20 oder
- C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),

25 mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 ausgenommen ist.

Alle vorstehend erwähnten Nukleinsäuren mit Promotoraktivität sind weiterhin in an sich bekannter Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäurebausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet, Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthetischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, beschrieben.

40 Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell

verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, zur Expression von Genen.

Unter einer Expressionseinheit wird erfindungsgemäß eine Nukleinsäure mit Expressionsaktivität verstanden, also eine Nukleinsäure verstanden, die in funktioneller Verknüpfung mit einer zu exprimierenden Nukleinsäure oder Gens, die Expression, also die Transkription und die Translation dieser Nukleinsäure oder dieses Gens reguliert.

Unter einer „funktionellen Verknüpfung“ versteht man in diesem Zusammenhang beispielsweise die sequentielle Anordnung einer der erfindungsgemäßen Expressionseinheit und einer transgen zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz und ggf. weiterer regulativer Elemente wie zum Beispiel einem Terminator derart, dass jedes der regulativen Elemente seine Funktion bei der transgenen Expression der Nukleinsäuresequenz erfüllen kann. Dazu ist nicht unbedingt eine direkte Verknüpfung im chemischen Sinne erforderlich. Genetische Kontrollsequenzen, wie zum Beispiel Enhancer-Sequenzen, können ihre Funktion auch von weiter entfernten Positionen oder gar von anderen DNA-Molekülen aus auf die Zielsequenz ausüben. Bevorzugt sind Anordnungen, in denen die transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz hinter (d.h. am 3'-Ende) der erfindungsgemäßen Expressionseinheitssequenz positioniert wird, so dass beide Sequenzen kovalent miteinander verbunden sind. Bevorzugt ist dabei der Abstand zwischen der Expressionseinheitssequenz und der transgen zu exprimierende Nukleinsäuresequenz geringer als 200 Basenpaare, besonders bevorzugt kleiner als 100 Basenpaare, ganz besonders bevorzugt kleiner als 50 Basenpaare.

Unter „Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein, also die Expressionsrate verstanden.

Unter „spezifischer Expressionsaktivität“ wird erfindungsgemäß die in einer bestimmten Zeit durch die Expressionseinheit gebildete Menge Protein pro Expressionseinheit verstanden.

Bei einer „verursachten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp die Bildung eines Proteins verursacht, das im Wildtyp so nicht vorhanden war.

Bei einer „veränderten Expressionsaktivität“ oder Expressionsrate im Bezug auf ein Gen im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit die gebildete Menge des Proteins verändert.

Unter „verändert“ wird in diesem Zusammenhang bevorzugt erhöht oder erniedrigt verstanden.

Dies kann beispielsweise durch Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität der endogenen Expressionseinheit, beispielsweise durch Mutation der Expressionseinheit oder durch Stimmulierung oder Hemmung der Expressionseinheit erfolgen.

Weiterhin kann die erhöhte Expressionsaktivität oder Expressionsrate beispielsweise durch Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität erreicht werden, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit Erhöhter spezifischer Expressionsaktivität dadurch erreicht, dass man

eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, enthalten eine erfindungsgemäße, vorstehend beschriebene Nukleinsäure mit Promotoraktivität und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Vorzugsweise enthält diese Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet, die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 42 als ribosomale Bindungsstelle.

5 In einer bevorzugten Ausführungsform enthält die erfindungsgemäße Expressionseinheit:

- E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
- F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
- G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
- H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).

15

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 stellt die Nukleinsäuresequenz der Expressionseinheit der Superoxid-Dismutase (Psod) aus Corynebakterium glutamicum dar. SEQ. ID.NO. 2 entspricht der Sequenz der Expressionseinheit des Wildtyps.

20 Die Erfindung betrifft weiterhin Expressionseinheiten, enthaltend eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist.

25 Weitere natürliche erfindungsgemäße Beispiele für erfindungsgemäße Expressioneinheiten lassen sich beispielsweise aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz bekannt ist, durch Identitätsvergleiche der Nukleinsäuresequenzen aus Datenbanken mit der vorstehend beschriebenen Sequenzen SEQ ID NO: 2 leicht auffinden.

30

Künstliche erfindungsgemäße Sequenzen der Expressionseinheiten lassen sich ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 durch künstliche Variation und Mutation, beispielsweise durch Substitution, Insertion oder Deletion von Nukleotiden leicht auffinden.

35

Unter einer Nukleinsäuresequenz, die eine Identität von mindestens 90 % mit der Sequenz SEQ ID NO: 2 aufweist, wird dementsprechend eine Nukleinsäuresequenz verstanden, die bei einem Vergleich seiner Sequenz mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, insbesondere nach obigen Programmlogarithmus mit obigem Parametersatz eine Identität

40 von mindestens 90 % aufweist.

Besonders bevorzugte Expressionseinheiten weisen mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 eine Identität von 91%, bevorzugter 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, besonders bevorzugt 99% auf.

5

Weitere natürliche Beispiele für Expressionseinheiten lassen sich weiterhin ausgehend von den vorstehend beschriebenen Nukleinsäuresequenzen, insbesondere ausgehend von der Sequenz SEQ ID NO: 2 aus verschiedenen Organismen, deren genomische Sequenz nicht bekannt ist, durch Hybridisierungstechniken in an sich bekannter Weise leicht auffinden.

10

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung betrifft daher Expressionseinheiten, enthaltend eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. No. 2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Diese Nukleinsäuresequenz umfasst mindestens 15 10, bevorzugter mehr als 12, 15, 30, 50 oder besonders bevorzugt mehr als 150 Nukleotid-e.

15

Unter "hybridisieren" versteht man die Fähigkeit eines Poly- oder Oligonukleotids unter stringenten Bedingungen an eine nahezu komplementäre Sequenz zu binden, während 20 unter diesen Bedingungen unspezifische Bindungen zwischen nicht-komplementären Partnern unterbleiben. Dazu sollten die Sequenzen vorzugsweise zu 90-100%, komplementär sein. Die Eigenschaft komplementärer Sequenzen, spezifisch aneinander binden zu können, macht man sich beispielsweise in der Northern- oder Southern-Blot-Technik oder bei der Primerbindung in PCR oder RT-PCR zunutze.

25

Die Hybridisierung erfolgt erfindungsgemäß unter stringenten Bedingungen. Solche Hybridisierungsbedingungen sind beispielsweise bei Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., in: Molecular Cloning (A Laboratory Manual), 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Seiten 9.31-9.57 oder in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6 beschrieben:

30

Unter stringenten Hybridisierungs-Bedingungen werden insbesondere verstanden: Die über Nacht Inkubation bei 42°C in einer Lösung bestehend aus 50 % Formamid, 5 x SSC (750 mM NaCl, 75 mM Tri-Natrium Citrat), 50 mM Natrium Phosphat (ph7,6), 5x 35 Denhardt Lösung, 10% Dextransulfat und 20 g/ml denaturierte, gescheerte Lachsspermien-DNA, gefolgt von einem Waschen der Filter mit 0,1x SSC bei 65°C.

30

Die erfindungsgemäß Nukleotidsequenzen ermöglichen ferner die Erzeugung von Sonden und Primern, die zur Identifizierung und/oder Klonierung von homologer Sequenzen in anderen Zelltypen und Mikroorganismen verwendbar sind. Solche Sonden

40

bzw. Primer umfassen gewöhnlich einen Nukleotidsequenzbereich, der unter stringen-
ten Bedingungen an mindestens etwa 12, vorzugsweise mindestens etwa 25, wie z.B.
etwa 40, 50 oder 75 aufeinanderfolgende Nukleotide eines Sense-Stranges einer erfin-
dungsgemäßen Nukleinsäuresequenz oder eines entsprechenden Antisense-Stranges
5 hybridisiert.

Erfindungsgemäß umfasst sind auch solche Nukleinsäuresequenzen, die sogenannte
stumme Mutationen umfassen oder entsprechend der Codon-Nutzung eins speziellen
Ursprungs- oder Wirtsorganismus, im Vergleich zu einer konkret genannten Sequenz
10 verändert sind, ebenso wie natürlich vorkommende Varianten, wie z.B. Spleißvarianten
oder Allelvarianten, davon.

Unter einem „funktionell äquivalenten Fragment“ werden für Expressionseinheiten,
Fragmente verstanden die im wesentlichen die gleiche oder eine höhere spezifische
15 Expressionsaktivität aufweisen wie die Ausgangssequenz.

Unter „im wesentlichen gleich“ wird eine spezifische Expressionsaktivität verstanden
die mindestens 50%, vorzugsweise 60%, bevorzugter 70%, bevorzugter 80%, bevor-
zugter 90%, besonders bevorzugt 95% der spezifischen Expressionsaktivität der Aus-
20 gangssequenz aufweist.

Unter „Fragmente“ werden Teilsequenzen der durch Ausführungsform E), F) oder G)
beschriebenen Expressionseinheiten verstanden. Vorzugsweise weisen diese Frag-
mente mehr als 10, bevorzugter aber mehr als 12,15, 30, 50 oder besonders bevor-
25 zugt mehr als 150 zusammenhängende Nukleotide der Nukleinsäuresequenz SEQ.
ID. NO. 1 auf.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 als
Expressionseinheit, d.h. zur Expression von Genen.
30 Die SEQ. ID. NO. 2 ist ohne Funktionszuordnung im Genbank-Eintrag AP005283 be-
schrieben worden. Daher betrifft die Erfindung ferner die neuen, erfindungsgemäßen
Expressionseinheiten.

35 Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend eine erfin-
dungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität zusätzlich funktionell verknüpft eine
Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

Besonders bevorzugt betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, enthaltend
40

E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von
Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 % auf
Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
5 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2
unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),
mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 ausgenom-
10 men ist.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten umfassen ein oder mehrere der folgen-
den genetischen Elemente: eine Minus 10 (" -10 ") Sequenz; eine Minus 35 (" -35 ") Se-
quenz; einen Transkriptionsstart, eine Enhancer Region; und eine Operator Region.
15 Vorzugsweise sind diese genetischen Elemente spezifisch für die Spezies Corynebak-
terien, speziell für *Corynbacterium glutamicum*.

Alle vorstehend erwähnten Expressionseinheiten sind weiterhin in an sich bekannter
20 Weise durch chemische Synthese aus den Nukleotidbausteinen wie beispielsweise
durch Fragmentkondensation einzelner überlappender, komplementärer Nukleinsäure-
bausteine der Doppelhelix herstellbar. Die chemische Synthese von Oligonukleotiden
kann beispielsweise, in bekannter Weise, nach der Phosphoamiditmethode (Voet,
Voet, 2. Auflage, Wiley Press New York, S. 896-897) erfolgen. Die Anlagerung synthe-
25 tischer Oligonukleotide und Auffüllen von Lücken mithilfe des Klenow-Fragmentes der
DNA-Polymerase und Ligationsreaktionen sowie allgemeine Klonierungsverfahren
werden in Sambrook et al. (1989), Molecular cloning: A laboratory manual, Cold Spring
Harbor Laboratory Press, beschrieben.

30 Für die Erfindungen in diesem Patent wurden Methoden und Techniken genutzt, die
dem Fachmann, der in mikrobiologischen und rekombinanten DNA-Techniken geübt
ist, bekannt sind. Methoden und Techniken für das Wachstum von Bakterienzellen, das
Einschleusen von isolierten DNA-Molekülen in die Wirtszelle, und die Isolierung, Klo-
nierung und Sequenzierung von isolierten Nukleinsäuremolekülen usw. sind Beispiele
35 für solche Techniken und Methoden. Diese Methoden sind in vielen Standardlitera-
turstellen beschrieben: Davis et al., Basic Methods In Molecular Biology (1986); J. H.
Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold
Spring Harbor, New York (1972); J.H. Miller, A Short Course in Bacterial Genetics,
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1992); M. Singer
40 and P. Berg, Genes & Genomes, University Science Books, Mill Valley, California

(1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989); P.B. Kaufmann et al., *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, B.R. Glick and J.E. Thompson, eds., CRC Press, Boca Raton, Florida (1993); and P.F. Smith-Kearny, *Molecular Genetics of Escherichia coli*, The Guilford Press, New York, NY (1989).

Alle Nukleinsäuremoleküle der vorliegenden Erfindung liegen bevorzugt in Form eines isolierten Nukleinsäuremoleküls vor. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure zugegen sind und kann überdies im wesentlichen frei von anderem zellulären Material oder Kulturmedium sein, wenn es durch rekombinante Techniken hergestellt wird, oder frei von chemischen Vorstufen oder anderen Chemikalien sein, wenn es chemisch synthetisiert wird.

Die Erfindung umfasst weiterhin die zu den konkret beschriebenen Nukleotidsequenzen komplementären Nukleinsäuremoleküle oder einen Abschnitt davon.

Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten lassen sich beispielsweise besonders vorteilhaft in verbesserten Verfahren zur fermentativen Herstellung von biosynthetischen Produkten wie nachstehend beschrieben verwenden.

Die erfindungsgemäßen Promotoren und/oder Expressionseinheiten weisen insbesondere den Vorteil auf, dass sie in Mikroorganismen durch Stress induziert werden. Durch geeignete Steuerung des Fermentationsprozesses lässt sich diese Stress-Induktion gezielt für eine Erhöhung der Transkriptions/Expressionsrate gewünschter Gene steuern. Insbesondere bei der Produktion von L-Lysin wird diese Stressphase sehr früh erreicht, so dass hier sehr früh eine erhöhte Transkriptions/Expressionsrate von gewünschten Genen erreicht werden kann.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten können zur Veränderung, also zur Erhöhung oder Reduzierung, oder zur Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp verwendet werden.

Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zur Regulation und Verstärkung der Bildung von verschiedenen biosynthetischen Produkten, wie beispielsweise Feinchemikalien, Proteinen, insbesondere Aminosäuren, in Mikroorganismen, insbesondere in *Corynebacterium species* dienen.

Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

- 10 a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder
- 15 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform a) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Promotoraktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Eine erhöhte bzw. erniedrigte Promotoraktivität kann dadurch erreicht werden, dass Nukleotide in der Bindungsstelle des RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen (dem Fachmann auch als –10-Region und –35 Region bekannt) ausgetauscht werden. Weiterhin dadurch dass der Abstand der beschriebenen RNA-Polymerase-Holoenzym-Bindungsstellen zueinander durch Deletionen von Nukleotiden oder Insertionen von Nukleotiden verkleinert oder vergrößert werden. Weiterhin dadurch dass Bindungsstellen (dem Fachmann auch als –Operatoren bekannt) für Regulatiosproteine (dem Fachmann bekannt als Repressoren und Aktivatoren) in räumliche Nähe an die Bindungsstellen des RNA-Polymerase-Holoenzymes gebracht werden, dass diese Regulatoren nach Bindung an eine Promotor-Sequenz die Bindung des und Transkriptionsaktivität des RNA-Polymerase-Holoenzymes abschwächen oder verstärken, oder auch unter einen neuen regulatorischen Einfluss stellen.

Die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 stellt vorzugsweise die ribosomale Bindungsstelle der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die Sequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 die –10-Region der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten dar.

Veränderungen der Nukleinsäuresequenz in diesen Regionen führen zu einer Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität.

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 als ribosomale Bindungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.

Insbesondere betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. Vorzugsweise wird dabei die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. als ribosomale Bindungsstelle verwendet .

Weiterhin betrifft die Erfindung eine Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend mindestens eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43. Vorzugsweise wird dabei eine der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region verwendet.

In Bezug auf die „spezifische Promotoraktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 1 verstanden.

Gemäß Ausführungsform b) kann die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität oder durch Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

35 Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promo-

toraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

5 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

15 Es ist somit möglich, die Transkriptionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

20 gemäß Ausführungsform b1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere endogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, endogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

30 Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende endogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35 Ferner ist es somit möglich, die Transkriptionsrate eines exogenen Gens im Vergleich zum Wildtyps zu verursachen, indem man

40 gemäß Ausführungsform b2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten, exogenen Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Pro-

motoraktivität, erfolgt oder

Gemäß Ausführungsform b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform b2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorzugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform b3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal. Eine „chromosomale“ Integration ist die Insertion eines exogenen DNA-Fragmentes in das Chromosom einer Wirtszelle. Dieser Begriff wird auch für die homologe Rekombination zwischen einem exogenen DNA-Fragment und der entsprechenden Region auf dem Chromosom der Wirtszelle genutzt.

In Ausführungsform b) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Nukleinsäuren mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform b), wie in Ausführungsform a) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

Unter „endogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die bereits im Wildtypgenom enthalten sind.

Unter „exogen“ werden genetische Informationen, wie beispielsweise Gene, verstanden, die im Wildtypgenom nicht enthalten sind.

Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf Regulation der Transkription durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen zu transkribierenden Bereich, also beispielsweise einen Bereich der die Translation reguliert, einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls weitere Regulationselemente, wie beispielsweise einen Terminator, enthalten.

Unter dem Begriff „Gene“ in Bezug auf die nachstehend beschriebene Regulation der Expression durch die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten werden vorzugsweise Nukleinsäuren verstanden, die einen kodierenden Bereich, sowie gegebenenfalls wei-

dogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten erfindungsgemäßen Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

5 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

20 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

25 br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

30 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp oder

35 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Gemäß Ausführungsform c) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass im Mikroorganismus die spezifische Expressionsaktivität verändert, also erhöht oder erniedrigt wird. Dies kann beispielsweise durch gezielte Mutation der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz mit Promotoraktivität, also durch gezielte Substitution, Deletion oder Insertion von Nukleotiden erfolgen. Beispielsweise führt die Verlängerung des Abstandes zwischen Shine-Dalgarno-Sequenz und dem translationellen Startcodon in der Regel zu einer Änderung, einer Verkleinerung oder aber auch einer Verstärkung der spezifischen Expressionsaktivität. Eine Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität kann auch dadurch erreicht werden, dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region (Ribosomale Bindungsstelle) in seinem Abstand zum translationellen Startcodon durch Deletionen oder Insertionen von Nukleotiden entweder verkürzt oder verlängert wird. Aber auch dadurch dass die Sequenz der Shine-Dalgarno-Region so verändert wird, dass die Homologie zu komplementären 3' Seite 16S rRNA entweder verstärkt oder aber auch verringert wird.

In Bezug auf die „spezifische Expressionsaktivität“ wird unter Erhöhung oder Reduzierung im Vergleich zum Wildtyp eine Erhöhung oder Reduzierung der spezifischen Aktivität gegenüber der erfindungsgemäßen Expressionseinheit des Wildtyps, also beispielsweise gegenüber der SEQ. ID. NO. 2 verstanden.

Gemäß Ausführungsform d) kann die Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp dadurch erfolgen, dass man die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

Dies wird bevorzugt dadurch erreicht, dass man

- 30 d1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder
- 35 d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäß Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

Es ist somit möglich, die Expressionsrate eines endogenen Gens des Wildtyps zu verändern, also zu erhöhen oder zu erniedrigen indem man

gemäß Ausführungsform d1) eine oder mehrere erfindungsgemäß Expressionseinheiten, 10 gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäß, endogenen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend 20 eine erfindungsgemäß Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Ferner ist es somit möglich, die Expressionssrate eines exogenen Gens im Vergleich 25 zum Wildtyps zu verursachen, indem man

gemäß Ausführungsform d2) ein oder mehrere exogene Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäß, endogenen Expressionseinheiten, 30 gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

gemäß Ausführungsform d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäß Expressionseinheit, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende, exogene Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Insertion von Genen gemäß Ausführungsform d2) kann dabei so erfolgen, dass das Gen in kodierende Bereiche oder nicht-kodierende Bereiche integriert wird. Vorgezugsweise erfolgt die Insertion in nicht-kodierende Bereiche.

40

Die Insertion von Nukleinsäurekonstrukten gemäß Ausführungsform d3) kann dabei chromosomal oder extrachromosomal erfolgen. Vorzugsweise erfolgt die Insertion der Nukleinsäurekonstrukte chromosomal.

5 Die Nukleinsäurekonstrukte werden im folgenden auch als Expressionskassetten bezeichnet.

In Ausführungsform d) werden bevorzugt auch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) eingesetzt. Diese können in Ausführungsform d), wie in Ausführungsform d) beschrieben im Mikroorganismus vorliegen und hergestellt werden oder in isolierter Form in den Mikroorganismus eingebracht werden.

15 Die Erfindung betrifft ferner in einer bevorzugten Ausführungsform ein Verfahren zur Erhöhung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp indem man

20 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

25 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

30 Vorzugsweise wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform c) dadurch erreicht, dass man

35 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

40 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der erfindungsgemäßen, endogenen Expressionseinheiten, gegebenen-

falls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

5 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäß Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp, indem man

10 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, die die Expression der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

15 dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

25 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sind die Gene ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von

30 proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren

35 kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gege-

benenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

In einer besondere bevorzugten Ausführungsform sind die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt aus der Gruppe

- 5 Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthasel, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

Bevorzugte Proteine und Nukleinsäuren kodierend diese Proteine der vorstehend beschriebenen Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind Proteinsequenzen bzw. Nukleinsäuresequenzen mikrobiellen Ursprungs, vorzugsweise aus Bakterien der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium*, bevorzugt aus coryneformen Bakterien, besonders bevorzugt aus *Corynebakterium glutamicum*.

Beispiele für besonders bevorzugte Proteinsequenzen und die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, deren Bezugsdokument, sowie deren Bezeichnung im Bezugsdokument sind in Tabelle 1 aufgelistet:

Tabelle 1

Protein	Nukleinsäure kodierend	Bezugs-dokument	SEQ. ID. NO. im Bezugsdoku-
---------	------------------------	-----------------	-----------------------------

	Protein		ment
Aspartatkinase	ask oder lysC	EP1108790	DNA: 281 Protein: 3781
Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase	asd	EP1108790	DNA: 331 Protein: 3831
Dihydrodipicolinate-Synthetase	dapA	WO 0100843	DNA: 55 Protein: 56
Dihydrodipicolinate-Reduktase	dapB	WO 0100843	DNA: 35 Protein: 36
Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase	ddh	EP1108790	DNA : 3494 Protein : 6944
Diaminopicolinat-Decarboxylase	lysA	EP1108790	DNA: 3451 Prot.: 6951
Lysin-Exporter	lysE	EP1108790	DNA: 3455 Prot.: 6955
Arginyl-t-RNA Synthetase	argS	EP1108790	DNA: 3450 Prot.: 6950
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase	zwf	WO 0100844	DNA: 243 Prot.: 244
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	gap	WO 0100844	DNA: 187 Prot.: 188
3-Phosphoglycerat-kinase	pgk	WO 0100844	DNA: 69 Prot.: 70
Pyruvat-Carboxylase	pycA	EP1108790	DNA: 765 Prot.: 4265
Triosephosphat-Isomerase	tpi	WO 0100844	DNA: 61 Prot.: 62
Biotin-Ligase	birA	EP1108790	DNA: 786 Prot.: 4286
PEP-Carboxylase	pck	EP1108790	DNA: 3470 Prot.: 6970
Homoserin Kinase	thrB	WO 0100843	DNA: 173 Prot.: 174
Threonin Synthase	thrC	WO 0100843	DNA: 175 Prot.: 176
Threonin Export Carrier	thrE	WO 0251231	DNA: 41

			Prot.: 42
Threonin Efflux Protein	RXA2390	WO 0100843	DNA: 7 Prot.: 8
Threonin Dehydratase	ilvA	EP 1108790	DNA: 2328 Prot.: 5828
Homoserin-O-Acetyltransferase	metA	EP 1108790	DNA: 727 Prot: 4227
Cystathionin-gamma-synthase	metB	EP 1108790	DNA: 3491 Prot: 6991
Cystathionin-beta-Lyase	metC	EP 1108790	DNA: 2535 Prot: 6035
Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, -	meth	EP 1108790	DNA: 1663 Prot: 5163
O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase	metY	EP 1108790	DNA: 726 Prot: 4226
Methylentetrahydrofolat-Reduktase	metF	EP 1108790	DNA: 2379 Prot: 5879
D-3-Phosphoglycerat-Dehydrogenase	serA	EP 1108790	DNA: 1415 Prot: 4915
Phosphoserin-Phosphatase 1	serB	WO 0100843	DNA: 153 Prot.: 154
Phosphoserin-Phosphatase 2	serB	EP 1108790	DNA: 467 Prot: 3967
Phosphoserin-Phosphatase 3	serB	EP 1108790	DNA: 334 Prot.: 3834
Phosphoserin-Aminotransferase	serC	WO 0100843	DNA: 151 Prot.: 152
Serin Acetyl-Transferase	cysE	WO 0100843	DNA: 243 Prot.: 244
Cystein-Synthase I	cysK	EP 1108790	DNA: 2817 Prot.: 6317
Cystein Synthase II	CysM	EP 1108790	DNA: 2338 Prot.: 5838
Homoserin-Dehydrogenase	hom	EP 1108790	DNA: 3452 Prot.: 6952
Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase	metE	WO 0100843	DNA: 755 Prot.: 756

Serin-Hydroxymethyltransferase	glyA	WO 0100843	DNA: 143 Prot.: 144
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA247	EP 1108790	DNA: 3089 Prot.: 6589
Protein in Sulfat-Reduktion	RXA248	EP 1108790	DNA: 3090 Prot.: 6590
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1	CysN	EP 1108790	DNA: 3092 Prot.: 6592
Sulfatadenyltransferase Untereinheit 2	CysD	EP 1108790	DNA: 3093 Prot.: 6593
Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase	CysH	WO 02729029	DNA: 7 Prot.: 8
Ferredoxin-Sulfit-Reduktase	RXA073	WO 0100842	DNA: 329 Prot.: 330
Ferredoxin NADP Reduktase	RXA076	WO 0100843	DNA: 79 Prot.: 80
Transkriptioneller Regulator LuxR	luxR	WO 0100842	DNA: 297 Protein: 298
Transkriptioneller Regulator LysR1	lysR1	EP 1108790	DNA: 676 Protein: 4176
Transkriptioneller Regulator LysR2	lysR2	EP 1108790	DNA: 3228 Protein: 6728
Transkriptioneller Regulator LysR3	lysR3	EP 1108790	DNA: 2200 Protein: 5700
Malat-Quinon-Oxidoreduktase	mqa	WO 0100844	DNA: 569 Protein: 570
Transketolase	RXA2739	EP 1108790	DNA: 1740 Prot: 5240
Transaldolase	RXA2738	WO 0100844	DNA: 245 Prot: 246
OPCA	opca	WO 0100804	DNA: 79 Prot: 80
1-Phosphofructokinase 1	pfk1	WO 0100844	DNA: 55 Protein: 56
1-Phosphofructokinase 2	pfk2	WO 0100844	DNA: 57 Protein: 58
6-Phosphofructokinase 1	6-pfk1	EP 1108790	DNA: 1383 Protein: 4883

6-Phosphofructokinase 2	6-pfk2	DE 10112992	DNA: 1 Protein: 2
Fructose-1,6-bisphosphatase 1	fbr1	EP1108790	DNA: 1136 Protein: 4636
Pyruvat Oxidase	poxB	WO 0100844	DNA: 85 Protein: 86
RXA00655-Regulator	RXA655	US2003162267 .2	DNA: 1 Prot.: 2
RXN02910-Regulator	RXN2910	US2003162267 .2	DNA: 5 Prot.: 6
6-phosphogluconolactonase	RXA2735	WO 0100844	DNA: 1 Prot.: 2

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz der Fructose-1,6-bisphosphatase 2, oder auch fbr2 genannt, (SEQ. ID. NO. 41) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend eine Fructose-1,6-bisphosphatase 2 (SEQ. ID. NO. 40).

Ein weiteres Beispiel für eine besonders bevorzugte Proteinsequenz und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend dieses Protein aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, ist die Sequenz des Proteins in Sulfat-Reduktion, oder auch RXA077 genannt, (SEQ. ID. NO. 4) und die entsprechenden Nukleinsäuresequenz kodierend ein Protein in Sulfat-Reduktion (SEQ. ID. NO. 3)

Weitere besonders bevorzugte Proteinsequenzen aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren, weisen jeweils die in Tabelle 1 für dieses Protein angegebene Aminosäuresequenz auf, wobei das jeweilige Protein jeweils an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte2 für diese Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäurepositionen eine andere proteinogene Aminosäure aufweist als die jeweilige in Tabelle2/Spalte3 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure. In einer weiter bevorzugten Ausführungsform, weisen die Proteine an mindestens einer der in Tabelle 2/Spalte 2 für die Aminosäuresequenz angegebenen Aminosäureposition die in Tabelle2/Spalte4 in der gleichen Zeile angegebene Aminosäure auf. Es handelt sich bei den in Tabelle 2 angegebenen Proteine um mutierte Proteine des Biosyntheseweges von Aminosäuren, die besonders vorteilhafte Eigenschaften aufweisen und sich deshalb insbesondere zur Expression der entsprechenden Nukleinsäuren durch den erfindungsgemäßen Promotor und zur Herstellung von Aminosäuren eignen. Beispielsweise führt die Mutation T311I zu

einem Ausschalten der feedback-Inhibierung von ask.

Die entsprechenden Nukleinsäuren, die ein vorstehend beschriebenes mutiertes Protein aus Tabelle 2 kodieren, lassen sich durch übliche verfahren herstellen.

5

Als Ausgangspunkt zur Herstellung der Nukleinsäuresequenzen kodierend ein mutiertes Protein eignet sich beispielsweise das Genom eines *Corynebacterium glutamicum*-Stammes, der von der American Type Culture Collection unter der Bezeichnung ATCC 13032 erhältlich ist oder die in Tabelle 1 in Bezug genommenen Nukleinsäuresequen-

10 10 Für die Rückübersetzung der Aminosäuresequenz der mutierten Proteine in die Nukleinsäuresequenzen kodierend diese Proteine ist es vorteilhaft, die codon usage desjenigen Organismus zu verwenden, in den die Nukleinsäuresequenz eingebracht werden soll oder in der die Nukleinsäuresequenz vorliegt. Beispielsweise ist es vorteilhaft für *Corynebakterium glutamicum* die codon usage von *Corynebakterium glutamicum* zu verwenden. Die codon usage des jeweiligen Organismus lässt sich in an sich bekannter Weise aus Datenbanken oder Patentanmeldungen ermitteln, die zumindest ein Protein und ein Gen, das dieses Protein kodiert, aus dem gewünschten Organismus beschreiben.

20 20 Die Angaben in Tabelle 2 sind folgendermassen zu verstehen:

In Spalte 1 "Identifikation" wird eine eindeutige Bezeichnung für jede Sequenz in Bezug auf Tabelle 1 aufgeführt.

25 25 In Spalte 2 "AS-POS" bezieht sich die jeweilige Zahl auf die Aminosäureposition der entsprechenden Polypeptidsequenz aus Tabelle 1. Eine "26" in der Spalte "AS-POS" bedeutet demzufolge die Aminosäureposition 26 der entsprechend angegebenen Polypeptidsequenz. Die Zählung der Position beginnt N-Terminal bei +1.

30 30 In Spalte 3 "AS-Wildtyp" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Wildtyp-Stamm der Sequenz aus Tabelle 1.

35 35 In Spalte 4 "AS-Mutante" bezeichnet der jeweilige Buchstabe die Aminosäure – dargestellt im Ein-Buchstaben-Code- an der in Spalte 2 angegebenen Position beim entsprechenden Mutanten-Stamm.

In Spalte 5 "Funktion" wird die physiologische Funktion der entsprechenden Polypeptidsequenz aufgeführt.

Für ein mutiertes Protein mit einer bestimmten Funktion (Spalte 5) und einer bestimmten Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1) werden in den Spalten 2,3 und 4 mindestens eine Mutation, bei einigen Sequenzen auch mehrere Mutationen beschrieben. Diese mehreren Mutationen beziehen sich immer auf die jeweils

5 obenstehende, nächstliegendste Ausgangsaminosäuresequenz (Tabelle 1). Unter dem Begriff „mindestens eine der Aminosäurepositionen“ einer bestimmten Aminosäuresequenz wird vorzugsweise mindestens eine der für diese Aminosäuresequenz in Spalte 2, 3 und 4 beschriebenen Mutationen verstanden.

10 Ein-Buchstaben-Code der proteinogenen Aminosäuren:

- A Alanin
- C Cystein
- D Aspartat
- 15 E Glutamat
- F Phenylalanin
- G Glycin
- H His
- I Isoleucin
- 20 K Lysin
- L Leucin
- M Methionin
- N Asparagin
- P Prolin
- 25 Q Glutamin
- R Arginin
- S Serin
- T Threonin
- V Valin
- 30 W Tryptophan
- Y Tyrosin

Tabelle 2

Spalte 1	Spalte 2	Spalte 3	Spalte 4	Spalte 5
Identifikation	AS Position	AS Wildtyp	AS Mutante	Funktion
ask	317	S	A	Aspartatkina
	311	T	I	
	279	A	T	

asd	66	D	G	Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase
	234	R	H	
	272	D	E	
	285	K	E	
	20	L	F	
dapA	2	S	A	Dihydrodipicolinat Synthetase
	84	K	N	
	85	L	V	
dapB	91	D	A	Dihydrodipicolinat-Reduktase
	83	D	N	
ddh	174	D	E	Meso-Diaminopimelat-D-Dehydrogenase
	235	F	L	
	237	S	A	
lysA	265	A	D	Diaminopicolinat-Decarboxylase
	320	D	N	
	332	I	V	
argS	355	G	D	Arginyl-t-RNA-Synthetase
	156	A	S	
	513	V	A	
	540	H	R	
zwf	8	S	T	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
	150	T	A	
	321	G	S	
gap	264	G	S	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
pycA	7	S	L	Pyruvat-Carboxylase
	153	E	D	
	182	A	S	
	206	A	S	
	227	H	R	
	455	A	G	
	458	P	S	
	639	S	T	
	1008	R	H	
	1059	S	P	

	1120	D	E	
pck	162	H	Y	PEP-Carboxylase
	241	G	D	
	829	T	R	
thrB	103	S	A	Homoserin Kinase
	190	T	A	
	133	A	V	
	138	P	S	
thrC	69	G	R	Threonin Synthase
	478	T	I	
RXA330	85	I	M	Threonin-Efflux Protein
	161	F	I	
	195	G	D	
hom	104	V	I	Homoserin-Deydrogenase
	116	T	I	
	148	G	A	
	59	V	A	
	270	T	S	
	345	R	P	
	268	K	N	
	61	D	H	
	72	E	Q	
lysR1	80	R	H	transkriptioneller Regulator LysR1
lysR3	142	R	W	transkriptioneller Regulator LysR3
	179	A	T	
RXA2739	75	N	D	Transketolase
	329	A	T	
	332	A	T	
	556	V	I	
RXA2738	242	K	M	Transaldolase
opcA	107	Y	H	OpcA
	219	K	N	
	233	P	S	
	261	Y	H	
	312	S	F	
	65	G	R	Aspartat-1-Decarboxylase
	33	G	S	6- Phosphogluconolactonase

In den vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen sowie den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von

5 genetisch veränderten Mikroorganismen, den nachstehend beschriebenen genetisch veränderten Mikroorganismen und den nachstehend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten erfolgt das Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität, der erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, der vorstehend beschriebenen Gene und der vorstehend beschriebenen Nuk-

10 leinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus, insbesondere in corynefome Bakterien, vorzugsweise durch die SacB-Methode.

Die SacB-Methode ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise in Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A.; Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum, Gene. 1994 Jul 22;145(1):69-73 und Blomfield IC, Vaughn V, Rest RF, Eisenstein BI.; Allelic exchange in Escherichia coli using the Bacillus subtilis sacB gene and a temperature-sensitive pSC101 replicon; Mol Microbiol. 1991 Jun;5(6):1447-57 beschrieben.

20 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen von erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäßen Expressionseinheiten in den Mikroorganismus.

25

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorstehend beschriebenen erfindungsgemäßen Verfahren erfolgt die Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate und/oder Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen durch Einbringen der vorstehend beschriebenen Nukleinsäurekonstrukte oder Expressionskassetten in den Mikroorganismus.

Die Erfindung betrifft daher ferner eine Expressionskassette, umfassend

30 mindestens eine erfindungsgemäße Expressionseinheit

35 mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, also ein zu exprimierendes Gen und

gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente, wie beispielsweise einen Terminator,

wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

Vorzugsweise ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

10

Besonders bevorzugt ist die zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend

15

ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren

20

kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen.

25

Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend und deren Beispiele in Tabelle 1 und 2 beschrieben.

30

In den erfindungsgemäßen Expressionskassetten ist die physikalische Lage der Expressionseinheit relativ zum zu exprimierenden Gen so gewählt, daß die Expressionseinheit die Transkription und vorzugsweise auch die Translation des zu exprimierenden Gens reguliert und damit die Bildung eines oder mehrerer Proteine ermöglicht. Die "Bildung ermöglichen" beinhaltet dabei die konstitutive Steigerung der Bildung,

Abschwächung bzw. Blockierung der Bildung unter spezifischen Bedingungen und oder die Steigerung der Bildung unter spezifischen Bedingungen. Die "Bedingungen" umfassen dabei: (1) Zugabe einer Komponente zum Kulturmedium, (2) Entfernen einer

35

Komponente vom Kulturmedium, (3) Austausch einer Komponente im Kulturmedium durch eine zweite Komponente, (4) Erhöhung der Temperatur des Kulturmediums, (5) Erniedrigung der Temperatur des Kulturmediums, und (6) Regulierung der atmosphärischen Bedingungen, wie z.B. die Sauerstoff- oder Stickstoffkonzentration, in der das Kulturmedium gehalten wird.

40

Die Erfindung betrifft ferner einen Expressionsvektor enthaltend eine vorstehend beschriebene, erfindungsgemäße Expressionskassette.

Vektoren sind dem Fachmann wohl bekannt und können beispielsweise aus "Cloning Vectors" (Pouwels P. H. et al., Hrsg, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985) entnommen werden. Unter Vektoren sind außer Plasmiden auch alle anderen dem Fachmann bekannten Vektoren, wie beispielsweise Phagen, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Cosmide, und lineare oder zirkuläre DNA zu verstehen. Diese Vektoren können autonom im Wirtsorganismus repliziert oder chromosomal repliziert werden.

Als Plasmide eignen sich solche besonders bevorzugt, die in coryneformen Bakterien repliziert werden. Zahlreiche bekannte Plasmidvektoren, wie z. B. pZ1 (Menkel et al., Applied and Environmental Microbiology (1989) 64: 549-554), pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) oder pHs2-1 (Sonnen et al., Gene 107: 69-74 (1991)) beruhen auf den kryptischen Plasmiden pHM1519, pBL1 oder pGA1. Andere Plasmidvektoren, wie z. B. pCLiK5MCS, oder solche, die auf pCG4 (US-A 4,489,160) oder pNG2 (Serwold-Davis et al., FEMS Microbiology Letters 66, 119-124 (1990)) oder pAG1 (US-A 5,158,891) beruhen, können in gleicher Weise verwendet werden.

Weiterhin eignen sich auch solche Plasmidvektoren mit Hilfe derer man das Verfahren der Genamplifikation durch Integration in das Chromosom anwenden kann, so wie es beispielsweise von Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)) zur Duplikation bzw. Amplifikation des hom-thrB-Operons beschrieben wurde. Bei dieser Methode wird das vollständige Gen in einen Plasmidvektor kloniert, der in einem Wirt (typischerweise E. coli), nicht aber in C. glutamicum replizieren kann. Als Vektoren kommen beispielsweise pSUP301 (Sirnon et al., Bio/Technology 1, 784-791 (1983)), pK18mob oder pK19mob (Schäfer et al., Gene 145, 69-73 (1994)), Bernard et al., Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)), pEM1 (Schrumpf et al. 1991, Journal of Bacteriology 173: 4510-4516) oder pBGS8 (Spratt et al., 1986, Gene 41: 337-342) in Frage. Der Plasmidvektor, der das zu amplifizierende Gen enthält, wird anschließend durch Transformation in den gewünschten Stamm von C. glutamicum überführt. Methoden zur Transformation sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988)), Duncan und Shivnan (Biotechnology 7, 1067-1070 (1989)) und Tauch et al. (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) beschrieben.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch verändertern Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptions-

rate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

- a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder
- b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

- b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder
- b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

- ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Ge-

nen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer

5 Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

15 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch veränderten Mikroorganismus mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei

ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von

35 mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die

40 Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten

Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch verändertern Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

5 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

10 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

15 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

20 25 d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikrorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30 35 d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

Die Erfindung betrifft ferner einen genetisch verändertern Mikroorganismus mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

10 Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht, dass man

15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 Die Erfidnung betrifft ferner einen genetisch verändertern Mikroorganismus mit reduzierter Expressionsrate von mindetstens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, wobei,

35 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem edogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

40 dr)eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Express-

sionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

5 Ferner betrifft die Erfindung einen genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu eprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

10 Besonders bevorzugt enthält dieser genetisch veränderte Mikroorganismus eine erfindungsgemäße Expressionskassette.

15 Besonders bevorzugt betrifft die vorliegende Erfindung gentisch veränderte Mikroorganismen, insbesondere coryneforme Bakterien, die einen Vektor, insbesondere Pendelvektor oder Plasmidvektor, der wenigstens ein rekombinantes Nukleinsäurekonstrukt erfindungsgemäßer Definition trägt, enthalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene mindestens eine Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von Feinchemikalien.

20 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der genetisch veränderten Mikroorganismen sind die vorstehend beschriebenen Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Konklenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein

25 aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

30 35 Bevorzugte Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-

40 Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkri-

tioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Deyhydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-5 Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthasel, Cystein-Synthase II

10 Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase

15

20 Besonders bevorzugte Beispiele der Proteine und Gene aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren sind vorstehend in Tabelle 1 und Tabelle 2 beschrieben.

Bevorzugte Mikroorganismen oder genetisch veränderte Mikroorganismen sind Bakterien, Algen, Pilze oder Hefen.

25 Besonders bevorzugte Mikroorgansimen sind insbeondere coryneforme Bakterien.

Bevorzugte coryneforme Bakterien sind Bakterien der Gattung *Corynebacterium*, insbesondere der Arten *Corynebacterium glutamicum*, *Corynebacterium acetoglutamicum*, *Corynebacterium acetoacidophilum*, *Corynebacterium thermoaminogenes*, *Corynebacterium melassecola* und *Corynebacterium efficiens* oder der Gattung *Brevibacterium*, insbesondere der Arten *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum* und *Brevibacterium divaricatum*.

30 Besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* sind ausgewählt aus der Gruppe *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032, *Corynebacterium acetoglutamicum* ATCC 15806, *Corynebacterium acetoacidophilum* ATCC 13870, *Corynebacterium thermoaminogenes* FERM BP-1539, *Corynebacterium melassecola* ATCC 17965, *Corynebacterium efficiens* DSM 44547, *Corynebacterium efficiens* DSM 44548, *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Brevibacterium flavum* ATCC 14067, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 13869, *Brevibacterium divarica-*

tum ATCC 14020, *Corynebacterium glutamicum* KFCC10065 und *Corynebacterium glutamicum* ATCC21608.

Mit der Abkürzung KFCC ist die Korean Federation of Culture Collection gemeint, mit
5 der Abkürzung ATCC die American type strain culture collection, mit der Abkürzung
DSM die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen.

Weitere besonders bevorzugte Bakterien der Gattungen *Corynebacterium* und *Brevibacterium* sind in Tabelle 3 aufgelistet:

10

Bakterium		Hinterlegungsnummer							
Genus	species	ATCC	FERM	NRRL	CECT	NCIMB	GBS	NCTC	DSMZ
Brevibacterium	ammoniagenes	21054							
Brevibacterium	ammoniagenes	19350							
Brevibacterium	ammoniagenes	19351							
Brevibacterium	ammoniagenes	19352							
Brevibacterium	ammoniagenes	19353							
Brevibacterium	ammoniagenes	19354							
Brevibacterium	ammoniagenes	19355							
Brevibacterium	ammoniagenes	19356							
Brevibacterium	ammoniagenes	21055							
Brevibacterium	ammoniagenes	21077							
Brevibacterium	ammoniagenes	21553							
Brevibacterium	ammoniagenes	21580							
Brevibacterium	ammoniagenes	39101							
Brevibacterium	butanicum	21196							
Brevibacterium	divaricatum	21792	P928						
Brevibacterium	flavum	21474							
Brevibacterium	flavum	21129							
Brevibacterium	flavum	21518							
Brevibacterium	flavum			B11474					
Brevibacterium	flavum			B11472					
Brevibacterium	flavum	21127							
Brevibacterium	flavum	21128							
Brevibacterium	flavum	21427							
Brevibacterium	flavum	21475							
Brevibacterium	flavum	21517							
Brevibacterium	flavum	21528							
Brevibacterium	flavum	21529							
Brevibacterium	flavum			B11477					
Brevibacterium	flavum			B11478					
Brevibacterium	flavum	21127							

<i>Brevibacterium</i>	<i>flavum</i>			B11474				
<i>Brevibacterium</i>	<i>healii</i>	15527						
<i>Brevibacterium</i>	<i>ketoglutamicum</i>	21004						
<i>Brevibacterium</i>	<i>ketoglutamicum</i>	21089						
<i>Brevibacterium</i>	<i>ketosoreductum</i>	21914						
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>				70			
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>				74			
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>				77			
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>	21798						
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>	21799						
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>	21800						
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>	21801						
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>			B11470				
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>			B11471				
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>	21086						
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>	21420						
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>	21086						
<i>Brevibacterium</i>	<i>lactofermentum</i>	31269						
<i>Brevibacterium</i>	<i>linens</i>	9174						
<i>Brevibacterium</i>	<i>linens</i>	19391						
<i>Brevibacterium</i>	<i>linens</i>	8377						
<i>Brevibacterium</i>	<i>paraffinolyticum</i>				11160			
<i>Brevibacterium</i>	<i>spec.</i>					717.73		
<i>Brevibacterium</i>	<i>spec.</i>					717.73		
<i>Brevibacterium</i>	<i>spec.</i>	14604						
<i>Brevibacterium</i>	<i>spec.</i>	21860						
<i>Brevibacterium</i>	<i>spec.</i>	21864						
<i>Brevibacterium</i>	<i>spec.</i>	21865						
<i>Brevibacterium</i>	<i>spec.</i>	21866						
<i>Brevibacterium</i>	<i>spec.</i>	19240						
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoacidophilum</i>	21476						
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoacidophilum</i>	13870						
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>			B11473				
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>			B11475				
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>	15806						
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>	21491						
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetoglutamicum</i>	31270						
<i>Corynebacterium</i>	<i>acetophilum</i>			B3671				
<i>Corynebacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	6872					2399	
<i>Corynebacterium</i>	<i>ammoniagenes</i>	15511						
<i>Corynebacterium</i>	<i>fujikense</i>	21496						
<i>Corynebacterium</i>	<i>glutamicum</i>	14067						

Corynebacterium	glutamicum	39137						
Corynebacterium	glutamicum	21254						
Corynebacterium	glutamicum	21255						
Corynebacterium	glutamicum	31830						
Corynebacterium	glutamicum	13032						
Corynebacterium	glutamicum	14305						
Corynebacterium	glutamicum	15455						
Corynebacterium	glutamicum	13058						
Corynebacterium	glutamicum	13059						
Corynebacterium	glutamicum	13060						
Corynebacterium	glutamicum	21492						
Corynebacterium	glutamicum	21513						
Corynebacterium	glutamicum	21526						
Corynebacterium	glutamicum	21543						
Corynebacterium	glutamicum	13287						
Corynebacterium	glutamicum	21851						
Corynebacterium	glutamicum	21253						
Corynebacterium	glutamicum	21514						
Corynebacterium	glutamicum	21516						
Corynebacterium	glutamicum	21299						
Corynebacterium	glutamicum	21300						
Corynebacterium	glutamicum	39684						
Corynebacterium	glutamicum	21488						
Corynebacterium	glutamicum	21649						
Corynebacterium	glutamicum	21650						
Corynebacterium	glutamicum	19223						
Corynebacterium	glutamicum	13869						
Corynebacterium	glutamicum	21157						
Corynebacterium	glutamicum	21158						
Corynebacterium	glutamicum	21159						
Corynebacterium	glutamicum	21355						
Corynebacterium	glutamicum	31808						
Corynebacterium	glutamicum	21674						
Corynebacterium	glutamicum	21562						
Corynebacterium	glutamicum	21563						
Corynebacterium	glutamicum	21564						
Corynebacterium	glutamicum	21565						
Corynebacterium	glutamicum	21566						
Corynebacterium	glutamicum	21567						
Corynebacterium	glutamicum	21568						
Corynebacterium	glutamicum	21569						
Corynebacterium	glutamicum	21570						

Corynebacterium	glutamicum	21571						
Corynebacterium	glutamicum	21572						
Corynebacterium	glutamicum	21573						
Corynebacterium	glutamicum	21579						
Corynebacterium	glutamicum	19049						
Corynebacterium	glutamicum	19050						
Corynebacterium	glutamicum	19051						
Corynebacterium	glutamicum	19052						
Corynebacterium	glutamicum	19053						
Corynebacterium	glutamicum	19054						
Corynebacterium	glutamicum	19055						
Corynebacterium	glutamicum	19056						
Corynebacterium	glutamicum	19057						
Corynebacterium	glutamicum	19058						
Corynebacterium	glutamicum	19059						
Corynebacterium	glutamicum	19060						
Corynebacterium	glutamicum	19185						
Corynebacterium	glutamicum	13286						
Corynebacterium	glutamicum	21515						
Corynebacterium	glutamicum	21527						
Corynebacterium	glutamicum	21544						
Corynebacterium	glutamicum	21492						
Corynebacterium	glutamicum				B8183			
Corynebacterium	glutamicum				B8182			
Corynebacterium	glutamicum				B12416			
Corynebacterium	glutamicum				B12417			
Corynebacterium	glutamicum				B12418			
Corynebacterium	glutamicum				B11476			
Corynebacterium	glutamicum	21608						
Corynebacterium	lilium		P973					
Corynebacterium	nitrilophilus	21419				11594		
Corynebacterium	spec.		P4445					
Corynebacterium	spec.		P4446					
Corynebacterium	spec.	31088						
Corynebacterium	spec.	31089						
Corynebacterium	spec.	31090						
Corynebacterium	spec.	31090						
Corynebacterium	spec.	31090						
Corynebacterium	spec.	15954						20145
Corynebacterium	spec.	21857						
Corynebacterium	spec.	21862						
Corynebacterium	spec.	21863						

Die Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA

5 FERM: Fermentation Research Institute, Chiba, Japan

NRRL: ARS Culture Collection, Northern Regional Research Laboratory, Peoria, IL, USA

CECT: Colección Espanola de Cultivos Tipo, Valencia, Spain

NCIMB: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Ltd., Aberdeen, UK

10 CBS: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, NL

NCTC: National Collection of Type Cultures, London, UK

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig, Germany

15 Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität und den erfindungsgemäßen Expressionseinheiten ist es mit Hilfe der vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen Verfahren möglich in den vorstehend beschriebenen, erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen die Stoffwechselwege zu spezifischen biosynthetischen Produkten zu regulieren.

20 Dazu werden beispielsweise Stoffwechselwege die zu einem spezifischen biosynthetischen Produkt führen durch Verursachung oder Erhöhung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von Genen dieses Biosyntheseweges verstärkt in dem die erhöhte Proteinmenge zu einer erhöhten Gesamtaktivität dieser Proteine des gewünschten

25 Biosyntheseweges und damit zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

Weiterhin können Stoffwechselwege die von einem spezifischen biosynthetischen Produkt wegführen durch Reduzierung der Transkriptionrate bzw. Expressionsrate von

30 Genen dieses wegführenden Biosyntheseweges abgeschwächt werden in dem die reduzierte Proteinmenge zu einer reduzierten Gesamtaktivität dieser Proteine des unerwünschten Biosyntheseweges und damit zusätzlich zu einem verstärkten Stoffwechselfluß zu dem gewünschten biosynthetischen Produkt führt.

35 Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen sind beispielsweise in der Lage aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol biosynthetische Produkte herzustellen.

40 Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganis-

men.

Je nach gewünschtem biosynthetischen Produkt muss die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate verschiedener Gene erhöht bzw. reduziert werden. In der Regel ist es

5 vorteilhaft die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate mehrere Gene zu verändern, d.h. die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu Erhöhen und/oder die Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate einer Kombination von Gene zu reduzieren.

10 In den erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen ist mindestens eine veränderte, dass heißt erhöhte oder reduzierte Transkriptionsrate bzw. Expressionsrate eines Gens auf eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität bzw. erfindungsgemäße Expressionseinheit zurückzuführen.

15 Weitere, zusätzliche veränderte, d.h. zusätzlich erhöhte oder zusätzlich reduzierte Transkriptionsraten bzw. Expressionsraten von weiteren Genen im genetisch veränderten Mikroorganismus können, müssen aber nicht auf die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität bzw. die erfindungsgemäßen Expressionseinheiten zurück gehen.

20 Die Erfindung betrifft deshalb weiterhin ein Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von erfindungsgemäßen, genetisch veränderten Mikroorganismen.

25 Bevorzugte biosynthetische Produkte sind Feinchemikalien.

Der Begriff "Feinchemikalie" ist im Fachgebiet bekannt und beinhaltet Verbindungen, die von einem Organismus produziert werden und in verschiedenen Industriezweigen Anwendungen finden, wie bspw., jedoch nicht beschränkt auf die pharmazeutische

30 Industrie, die Landwirtschafts-, Kosmetik, Food und Feed-Industrie. Diese Verbindungen umfassen organische Säuren, wie beispielsweise Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide (wie bspw. beschrieben in Ku-ninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology

35 Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten), Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren (bspw. Arachidonsäure), Diole (bspw. Propan-diol und Butandiol), Kohlenhydrate (bspw. Hyaluronsäure und Trehalose), aromatische Verbindungen (bspw. aromatische Amine, Vanillin und Indigo), Vitamine und Cofaktoren (wie beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27,

40 "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und

Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease"
Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological
Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien,
abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme und
5 sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Cor-
poration, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebe-
nen Chemikalien. Der Metabolismus und die Verwendungen bestimmter Feinchemika-
lien sind nachstehend weiter erläutert.

10 **I. Aminosäure-Metabolismus und Verwendungen**

Die Aminosäuren umfassen die grundlegenden Struktureinheiten sämtlicher Proteine und sind somit für die normalen Zellfunktionen essentiell. Der Begriff "Aminosäure" ist im Fachgebiet bekannt. Die proteinogenen Aminosäuren, von denen es 20 Arten gibt,
15 dienen als Struktureinheiten für Proteine, in denen sie über Peptidbindungen miteinan-
der verknüpft sind, wohingegen die nicht-proteinogenen Aminosäuren (von denen
Hunderte bekannt sind) gewöhnlich nicht in Proteinen vorkommen (siehe Ullmann's
Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97 VCH: Weinheim (1985)). Die
Aminosäuren können in der D- oder L-Konfiguration vorliegen, obwohl L-Aminosäuren
20 gewöhnlich der einzige Typ sind, den man in natürlich vorkommenden Proteinen vor-
findet. Biosynthese- und Abbaupfade von jeder der 20 proteinogenen Aminosäuren sind sowohl bei prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen gut charakterisiert
(siehe bspw. Stryer, L. Biochemistry, 3. Auflage, S. 578-590 (1988)). Die "essentiellen"
Aminosäuren (Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Threonin,
25 Tryptophan und Valin), so bezeichnet, da sie aufgrund der Komplexität ihrer Biosyn-
these mit der Ernährung aufgenommen werden müssen, werden durch einfache Bio-
syntheseswege in die übrigen 11 "nichtessentiellen" Aminosäuren (Alanin, Arginin,
Asparagin, Aspartat, Cystein, Glutamat, Glutamin, Glycin, Prolin, Serin und Tyrosin)
umgewandelt. Höhere Tiere besitzen die Fähigkeit, einige dieser Aminosäuren zu syn-
30 thetisieren, jedoch müssen die essentiellen Aminosäuren mit der Nahrung aufgenom-
men werden, damit eine normale Proteinsynthese stattfindet.

Abgesehen von ihrer Funktion bei der Proteinbiosynthese sind diese Aminosäuren inter-
essante Chemikalien an sich, und man hat entdeckt, daß viele bei verschiedenen An-
35 wendungen in der Nahrungsmittel-, Futter-, Chemie-, Kosmetik-, Landwirtschafts- und
pharmazeutischen Industrie zum Einsatz kommen. Lysin ist nicht nur für die Ernährung
des Menschen eine wichtige Aminosäure, sondern auch für monogastrische Tiere, wie
Geflügel und Schweine. Glutamat wird am häufigsten als Geschmacksadditiv (Mono-
natriumglutamat, MSG) sowie weithin in der Nahrungsmittelindustrie verwendet, wie
40 auch Aspartat, Phenylalanin, Glycin und Cystein. Glycin, L-Methionin und Tryptophan

werden sämtlich in der pharmazeutischen Industrie verwendet. Glutamin, Valin, Leucin, Isoleucin, Histidin, Arginin, Prolin, Serin und Alanin werden in der pharmazeutischen Industrie und der Kosmetikindustrie verwendet. Threonin, Tryptophan und D-/L-Methionin sind weitverbreitete Futtermittelzusätze (Leuchtenberger, W. (1996) Amino acids - technical production and use, S. 466-502 in Rehm et al., (Hrsg.) Biotechnology Bd. 6, Kapitel 14a, VCH: Weinheim). Man hat entdeckt, daß sich diese Aminosäuren außerdem als Vorstufen für die Synthese von synthetischen Aminosäuren und Proteinen, wie N-Acetylcystein, S-Carboxymethyl-L-cystein, (S)-5-Hydroxytryptophan und anderen, in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 57-97, VCH, 10 Weinheim, 1985 beschriebenen Substanzen eignen.

Die Biosynthese dieser natürlichen Aminosäuren in Organismen, die sie produzieren können, bspw. Bakterien, ist gut charakterisiert worden (für einen Überblick der bakteriellen Aminosäure-Biosynthese und ihrer Regulation, s. Umbarger, H.E. (1978) Ann. Rev. Biochem. 47: 533 - 606). Glutamat wird durch reduktive Aminierung von α -Ketoglutarat, einem Zwischenprodukt im Citronensäure-Zyklus, synthetisiert. Glutamin, Prolin und Arginin werden jeweils nacheinander aus Glutamat erzeugt. Die Biosynthese von Serin erfolgt in einem Dreischritt-Verfahren und beginnt mit 3-Phosphoglycerat (einem Zwischenprodukt bei der Glykolyse), und ergibt nach Oxidations-, Transaminierungs- und Hydrolyseschritten diese Aminosäure. Cystein und Glycerin werden jeweils aus Serin produziert, und zwar die erstere durch Kondensation von Homocystein mit Serin, und die letztere durch Übertragung des Seitenketten- β -Kohlenstoffatoms auf Tetrahydrofolat, in einer durch Serintranshydroxymethylase katalysierten Reaktion. Phenylalanin und Tyrosin werden aus den Vorstufen des Glykolyse- und Pentosephosphatweges, Erythrose-4-phosphat und Phosphoenolpyruvat in einem 9-Schritt-Biosyntheseweg synthetisiert, der sich nur in den letzten beiden Schritten nach der Synthese von Prephenat unterscheidet. Tryptophan wird ebenfalls aus diesen beiden Ausgangsmolekülen produziert, jedoch erfolgt dessen Synthese in einem 11-Schritt-Weg. Tyrosin läßt sich in einer durch Phenylalaninhydroxylase katalysierten Reaktion auch aus Phenylalanin herstellen. Alanin, Valin und Leucin sind jeweils Biosyntheseprodukte aus Pyruvat, dem Endprodukt der Glykolyse. Aspartat wird aus Oxalacetat, einem Zwischenprodukt des Citratzyklus, gebildet. Asparagin, Methionin, Threonin und Lysin werden jeweils durch Umwandlung von Aspartat produziert. Isoleucin wird aus Threonin gebildet. In einem komplexen 9-Schritt-Weg erfolgt die Bildung von Histidin aus 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat, einem aktivierten Zucker.

Aminosäuren, deren Menge den Proteinbiosynthesebedarf der Zelle übersteigt, können nicht gespeichert werden, und werden stattdessen abgebaut, so daß Zwischenprodukte für die Haupt-Stoffwechselwege der Zelle bereitgestellt werden (für einen Überblick siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl. Kap. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea

Cycle"; S 495-516 (1988)). Die Zelle ist zwar in der Lage, ungewünschte Aminosäuren in nützliche Stoffwechsel-Zwischenprodukte umzuwandeln, jedoch ist die Aminosäureproduktion hinsichtlich der Energie, der Vorstufenmoleküle und der für ihre Synthese nötigen Enzyme aufwendig. Es überrascht daher nicht, daß die Aminosäure-

5 Biosynthese durch Feedback-Hemmung reguliert wird, wobei das Vorliegen einer bestimmten Aminosäure ihre eigene Produktion verlangsamt oder ganz beendet (für einen Überblick über den Rückkopplungs-Mechanismus bei Aminosäure-Biosynthesewegen, siehe Stryer, L., Biochemistry, 3. Aufl., Kap. 24, "Biosynthesis of Amino Acids and Heme", S. 575-600 (1988)). Der Ausstoß einer bestimmten Amino-
10 säure wird daher durch die Menge dieser Aminosäure in der Zelle eingeschränkt.

II. Vitamine, Cofaktoren und Nutraceutika-Metabolismus sowie Verwendungen

Vitamine, Cofaktoren und Nutraceutika umfassen eine weitere Gruppe von Molekülen.
15 Höhere Tiere haben die Fähigkeit verloren, diese zu synthetisieren und müssen sie somit aufnehmen, obwohl sie leicht durch andere Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden. Diese Moleküle sind entweder biologisch aktive Moleküle an sich oder Vorstufen von biologisch aktiven Substanzen, die als Elektronenträger oder Zwischenprodukte bei einer Reihe von Stoffwechselwegen dienen. Diese Verbindungen haben
20 neben ihrem Nährwert auch einen signifikanten industriellen Wert als Farbstoffe, Antioxidantien und Katalysatoren oder andere Verarbeitungs-Hilfsstoffe. (Für einen Überblick über die Struktur, Aktivität und die industriellen Anwendungen dieser Verbindungen siehe bspw. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996). Der Begriff "Vitamin" ist im Fachgebiet bekannt
25 und umfaßt Nährstoffe, die von einem Organismus für eine normale Funktion benötigt werden, jedoch nicht von diesem Organismus selbst synthetisiert werden können. Die Gruppe der Vitamine kann Cofaktoren und nutraceutische Verbindungen umfassen. Der Begriff "Cofaktor" umfaßt nicht-proteinartige Verbindungen, die für das Auftreten einer normalen Enzymaktivität nötig sind. Diese Verbindungen können organisch oder
30 anorganisch sein; die erfindungsgemäßen Cofaktor-Moleküle sind vorzugsweise organisch. Der Begriff "Nutraceutikum" umfaßt Nahrungsmittelzusätze, die bei Pflanzen und Tieren, insbesondere dem Menschen, gesundheitsfördernd sind. Beispiele solcher Moleküle sind Vitamine, Antioxidantien und ebenfalls bestimmte Lipide (z.B. mehrfach ungesättigte Fettsäuren).
35 Die Biosynthese dieser Moleküle in Organismen, die zu ihrer Produktion befähigt sind, wie Bakterien, ist umfassend charakterisiert worden (Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, "Vitamins", Bd. A27, S. 443-613, VCH: Weinheim, 1996, Michal, G. (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and
40

Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press, Champaign, IL X, 374 S).

5 Thiamin (Vitamin B₁) wird durch chemisches Kuppeln von Pyrimidin und Thiazol-Einheiten gebildet. Riboflavin (Vitamin B₂) wird aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Ribose-5'-phosphat synthetisiert. Riboflavin wiederum wird zur Synthese von Flavin-mononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) eingesetzt. Die Familie von Verbindungen, die gemeinsam als "Vitamin B6" bezeichnet werden (bspw. Pyridoxin,

10 Pyridoxamin, Pyridoxal-5'-phosphat und das kommerziell verwendete Pyridoxin-hydrochlorid), sind alle Derivate der gemeinsamen Struktureinheit 5-Hydroxy-6-methylpyridin. Pantothenat (Pantothensäure, R-(+)-N-(2,4-Dihydroxy-3,3-dimethyl-1-oxobutyl)-β-alanin) kann entweder durch chemische Synthese oder durch Fermentation hergestellt werden. Die letzten Schritte bei der Pantothenat-Biosynthese bestehen aus

15 der ATP-getriebenen Kondensation von β-Alanin und Pantoinsäure. Die für die Biosyntheseschritte für die Umwandlung in Pantoinsäure, in β-Alanin und zur Kondensation in Pantothensäure verantwortlichen Enzyme sind bekannt. Die metabolisch aktive Form von Pantothenat ist Coenzym A, dessen Biosynthese über 5 enzymatische Schritte verläuft. Pantothenat, Pyridoxal-5'-phosphat, Cystein und ATP sind die Vorstufen von

20 Coenzym A. Diese Enzyme katalysieren nicht nur die Bildung von Pantothenat, sondern auch die Produktion von (R)-Pantoinsäure, (R)-Pantolacton, (R)-Panthenol (Provitamin B₅), Pantethein (und seinen Derivaten) und Coenzym A.

25 Die Biosynthese von Biotin aus dem Vorstufenmolekül Pimeloyl-CoA in Mikroorganismen ist ausführlich untersucht worden, und man hat mehrere der beteiligten Gene identifiziert. Es hat sich herausgestellt, daß viele der entsprechenden Proteine an der Fe-Cluster-Synthese beteiligt sind und zu der Klasse der nifS-Proteine gehören. Die Liponsäure wird von der Octanonsäure abgeleitet und dient als Coenzym beim Energie-Metabolismus, wo sie Bestandteil des Pyruvatdehydrogenasekomplexes und des

30 α-Ketoglutaratdehydrogenasekomplexes wird. Die Folate sind eine Gruppe von Substanzen, die alle von der Folsäure abgeleitet werden, die wiederum von L-Glutaminsäure, p-Aminobenzoësäure und 6-Methylpterin hergeleitet ist. Die Biosynthese der Folsäure und ihrer Derivate, ausgehend von den metabolischen Stoffwechselzwischenprodukten Guanosin-5'-triphosphat (GTP), L-Glutaminsäure und p-

35 Aminobenzoësäure ist in bestimmten Mikroorganismen eingehend untersucht worden.

40 Corrinoide (wie die Cobalamine und insbesondere Vitamin B₁₂) und die Porphyrine gehören zu einer Gruppe von Chemikalien, die sich durch ein Tetrapyrrol-Ringsystem auszeichnen. Die Biosynthese von Vitamin B₁₂ ist hinreichend komplex, daß sie noch nicht vollständig charakterisiert worden ist, jedoch ist inzwischen ein Großteil der betei-

ligten Enzyme und Substrate bekannt. Nikotinsäure (Nikotinat) und Nikotinamid sind Pyridin-Derivate, die auch als "Niacin" bezeichnet werden. Niacin ist die Vorstufe der wichtigen Coenzyme NAD (Nikotinamidadenindinukleotid) und NADP (Nikotinamidadenindinukleotidphosphat) und ihrer reduzierten Formen.

5

Die Produktion dieser Verbindungen im Großmaßstab beruht größtenteils auf zellfreien chemischen Synthesen, obwohl einige dieser Chemikalien ebenfalls durch großangelegte Anzucht von Mikroorganismen produziert worden sind, wie Riboflavin, Vitamin B₆, Pantothenat und Biotin. Nur Vitamin B₁₂ wird aufgrund der Komplexität seiner Synthese lediglich durch Fermentation produziert. In-vitro-Verfahren erfordern einen erheblichen Aufwand an Materialien und Zeit und häufig an hohen Kosten.

III. Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- und Nukleotid-Metabolismus und Verwendungen

15 Gene für den Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel und ihre entsprechenden Proteine sind wichtige Ziele für die Therapie von Tumorerkrankungen und Virusinfektionen. Der Begriff "Purin" oder "Pyrimidin" umfaßt stickstoffhaltige Basen, die Bestandteil der Nuklein-säuren, Coenzyme und Nukleotide sind. Der Begriff "Nukleotid" beinhaltet die grundlegenden Struktureinheiten der Nukleinsäuremoleküle, die eine stickstoffhaltige Base, 20 einen Pentose-Zucker (bei RNA ist der Zucker Ribose, bei DNA ist der Zucker D-Desoxyribose) und Phosphorsäure umfassen. Der Begriff "Nukleosid" umfaßt Moleküle, die als Vorstufen von Nukleotiden dienen, die aber im Gegensatz zu den Nukleotiden keine Phosphorsäureeinheit aufweisen. Durch Hemmen der Biosynthese dieser Moleküle oder ihrer Mobilisation zur Bildung von Nukleinsäuremolekülen ist es möglich, die 25 RNA- und DNA-Synthese zu hemmen; wird diese Aktivität zielgerichtet bei kanzerogenen Zellen gehemmt, lässt sich die Teilungs- und Replikations-Fähigkeit von Tumorzellen hemmen.

Es gibt zudem Nukleotide, die keine Nukleinsäuremoleküle bilden, jedoch als Energie-30 speicher (d.h. AMP) oder als Coenzyme (d.h. FAD und NAD) dienen.

Mehrere Veröffentlichungen haben die Verwendung dieser Chemikalien für diese medizinischen Indikationen beschrieben, wobei der Purin- und/oder Pyrimidin-Metabolismus beeinflußt wird (bspw. Christopherson, R.I. und Lyons, S.D. (1990) "Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents", Med. Res. Reviews 10: 505-548). Untersuchungen an Enzymen, die am Purin- und Pyrimidin-Metabolismus beteiligt sind, haben sich auf die Entwicklung neuer Medikamente konzentriert, die bspw. als Immunsuppressionsmittel oder Antiproliferantien verwendet werden können (Smith, J.L. "Enzymes in Nucleotide Synthesis" Curr. Opin. Struct. Biol. 5 (1995) 752-757; Biochem. Soc. Transact. 23 (1995) 877-902). Die Purin-40

und Pyrimidinbasen, Nukleoside und Nukleotide haben jedoch auch andere Einsatzmöglichkeiten: als Zwischenprodukte bei der Biosynthese verschiedener Feinchemikalien (z.B. Thiamin, S-Adenosyl-methionin, Folate oder Riboflavin), als Energieträger für die Zelle (bspw. ATP oder GTP) und für Chemikalien selbst, werden gewöhnlich als Geschmacksverstärker verwendet (bspw. IMP oder GMP) oder für viele medizinische Anwendungen (siehe bspw. Kuninaka, A., (1996) "Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology Bd. 6, Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim, S. 561-612). Enzyme, die am Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid- oder Nukleotid-Metabolismus beteiligt sind, dienen auch immer stärker als Ziele, gegen die Chemikalien für den Pflanzenschutz, einschließlich Fungiziden, Herbiziden und Insektiziden entwickelt werden.

Der Metabolismus dieser Verbindungen in Bakterien ist charakterisiert worden (für Übersichten siehe bspw. Zalkin, H. und Dixon, J.E. (1992) "De novo purin nucleotide biosynthesis" in Progress in Nucleic Acids Research and Molecular biology, Bd. 42, Academic Press, S. 259-287; und Michal, G. (1999) "Nucleotides and Nucleosides"; Kap. 8 in : Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology, Wiley, New York). Der Purin-Metabolismus, das Objekt intensiver Forschung, ist für das normale Funktionieren der Zelle essentiell. Ein gestörter Purin-Metabolismus in höheren Tieren kann schwere Erkrankungen verursachen, bspw. Gicht. Die Purinnukleotide werden über eine Reihe von Schritten über die Zwischenverbindung Inosin-5'-phosphat (IMP) aus Ribose-5-phosphat synthetisiert, was zur Produktion von Guanosin-5'-monophosphat (GMP) oder Adenosin-5'-monophosphat (AMP) führt, aus denen sich die als Nukleotide verwendeten Triphosphatformen leicht herstellen lassen. Diese Verbindungen werden auch als Energiespeicher verwendet, so daß ihr Abbau Energie für viele verschiedene biochemische Prozesse in der Zelle liefert. Die Pyrimidinbiosynthese erfolgt über die Bildung von Uridin-5'-monophosphat (UMP) aus Ribose-5-phosphat. UMP wiederum wird in Cytidin-5'-triphosphat (CTP) umgewandelt. Die Desoxyformen sämtlicher Nukleotide werden in einer Einschritt-Reduktionsreaktion aus der Diphosphat-Riboseform des Nukleotides zur Diphosphat-Desoxyriboseform des Nukleotides hergestellt. Nach der Phosphorylierung können diese Moleküle an der DNA-Synthese teilnehmen.

IV. Trehalose-Metabolismus und Verwendungen

Trehalose besteht aus zwei Glucosemolekülen, die über α,α -1,1-Bindung miteinander verknüpft sind. Sie wird gewöhnlich in der Nahrungsmittelindustrie als Süßstoff, als Additiv für getrocknete oder gefrorene Nahrungsmittel sowie in Getränken verwendet. Sie wird jedoch auch in der pharmazeutischen Industrie, der Kosmetik- und Biotechnologie-Industrie angewendet (s. bspw. Nishimoto et al., (1998) US-Patent Nr. 5 759 610; Singer, M.A. und Lindquist, S. Trends Biotech. 16 (1998) 460-467; Paiva, C.L.A. und

Panek, A.D. Biotech Ann. Rev. 2 (1996) 293-314; und Shiosaka, M. J. Japan 172 (1997) 97-102). Trehalose wird durch Enzyme von vielen Mikroorganismen produziert und auf natürliche Weise in das umgebende Medium abgegeben, aus dem sie durch im Fachgebiet bekannte Verfahren gewonnen werden kann.

5

Besonders bevorzugte biosynthetische Produkte sind ausgewählt aus der Gruppe organische Säuren, Proteine, Nukleotide und Nukleoside, sowohl proteinogene als auch nicht-proteinogene Aminosäuren, Lipide und Fettsäuren, Diole, Kohlehydrate, aromatische Verbindungen, Vitamine und Cofaktoren, Enzyme und Proteine.

10

Bevorzugte organische Säuren sind Weinsäure, Itaconsäure und Diaminopimelinsäure

Bevorzugte Nukleoside und Nukleotide sind beispielsweise beschrieben in Kuninaka, A. (1996) Nucleotides and related compounds, S. 561-612, in Biotechnology Bd. 6,

15

Rehm et al., Hrsg. VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten.

20

Bevorzugte biosynthetische Produkte sind weiterhin Lipide, gesättigte und ungesättigte Fettsäuren, wie beispielsweise Arachidonsäure, Diole wie beispielsweise Propandiol und Butandiol, Kohlenhydrate, wie beispielsweise Hyaluronsäure und Trehalose, aromatische Verbindungen, wie beispielsweise aromatische Amine, Vanillin und Indigo, Vitamine und Cofaktoren, wie beispielsweise beschrieben in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A27, "Vitamins", S. 443-613 (1996) VCH: Weinheim und den darin enthaltenen Zitaten; und Ong, A.S., Niki, E. und Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health and Disease" Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia and the Society for Free Radical Research - Asien, abgehalten am 1.-3. Sept. 1994 in Penang, Malaysia, AOCS Press (1995)), Enzyme Polyketide (Cane et al. (1998) Science 282: 63-68), und sämtliche anderen von Gutcho (1983) in Chemicals by Fermentation, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 und den darin angegebenen Literaturstellen, beschriebenen Chemikalien.

25

Bevorzugte biosynthetische Produkte sind Aminosäuren, besonders bevorzugt essentielle Aminosäuren, insbesondere L-Glycin, L-Alanin, L-leucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Tryptophan, L-Lysin, L-Glutamin, L-Glutaminsäure, L-Serin, L-Prolin, L-Valin, L-Isoleucin, L-Cystein, L-Tyrosin, L-Histidin, L-Arginin, L-Asparagin, L-

30

Asparaginsäure und L-Threonin, L-Homoserin, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin. Im folgenden wird unter einer Aminosäure, wie beispielsweise Lysin, Methionin und Threonin, sowohl jeweils die L- und die D-Form der Aminosäure, vorzugsweise die L-Form, also beispielsweise L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin verstanden.

35

40

Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

- 5 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder
- 10 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat- Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydridipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Deydrognease, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrognease, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase.

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

40 dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus ein-

bringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

- 5 5 dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder
- 10 10 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.
- 15 15 Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat- Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydridipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydridipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Deydrogense-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogense-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 30 30 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Lysin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-

Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

5 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man

10 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

15 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

20 und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-

25 Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-

30 Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-TransferaseNukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase Aktivität

35 II , Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Nukleinsäuren

40 kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Nukleinsäuren kodierend eine

Feredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend eine, RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.

5

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

10

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

15

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikrorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

25

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Homoserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serine Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase-Aktivität, Cystein-Synthase II -Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-

Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfat-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und 5 Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Methionin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

10 15 Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionseinheit verursacht sein.

20 25 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen mit erhöhter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, wobei man ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheit, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

30 35 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten oder durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform ch) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind,

40 und wobei die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren

kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-
5 Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin-Exporter,
Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Phospho-
holpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nuklein-
säuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Op-
cA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren ko-
dierend eine 6-Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-
10 Dehydrogenase

Wie vorstehend bei den Verfahren beschrieben, wird die Regulation der Expression
dieser Genen im Mikroorganismus durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten o-
der durch erfindungsgemäße Expressionseinheiten mit erhöhter spezifischer Expressi-
15 onsaktivität gemäß Ausführungsform ch) dadurch erreicht, dass man

dh1) eine oder mehrere erfindungsgemäße Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit
erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus ein-
bringt, so dass die Expression eines oder mehrerer dieser endogenen Gene unter der
20 Kontrolle der eingebrachten, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenen-
falls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

dh2) ein oder mehrere dieser Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so
dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle
25 der endogenen, erfindungsgemäßen Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhö-
ter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine erfindungsgemäße
Expressionseinheit, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und
30 funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mik-
roorganismus einbringt.

Eine weiter bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens
zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch
35 veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte
Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe
Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinal-
dehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyru-
vat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-
40 Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketola-

se-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.

Eine weiter besonders bevorzugte Ausführungsform des vorstehend beschriebenen Verfahrens zur Herstellung von Threonin ist dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität, Ketol-Aid-Reductoisomerase-Aktivität, Branched chain aminotransferase-Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methion Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

Diese zusätzlichen, erhöhten oder reduzierten Aktivitäten mindestens einer der vorstehend beschriebenen Aktivitäten können, müssen aber nicht durch eine erfindungsgemäße Nukleinsäure mit Promotoraktivität und/oder eine erfindungsgemäße Expressionsseinheit verursacht sein.

Unter dem Begriff der „Aktivität“ eines Proteins wird bei Enzymen die Enzymaktivität des entsprechenden Proteins, bei anderen Proteinen, beispielsweise Struktur oder Transport-Proteinen die physiologische Aktivität der Proteine verstanden.

Die Enzyme sind in der Regel in der Lage ein Substrat in ein Produkt umzuwandeln bzw. diesen Umwandlungsschritt zu katalysieren.

35 Dementsprechend wird unter der „Aktivität“ eines Enzyms die in einer bestimmten Zeit durch das Enzym umgesetzte Menge Substrat bzw. gebildete Menge Produkt verstanden.

Bei einer erhöhten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat

bzw. die gebildete Menge Produkt erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der „Aktivität“ bei allen vorstehend und nachstehend beschriebenen Aktivitäten mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %,

5 weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der „Aktivität des Wildtyps“.

Bei einer reduzierten Aktivität im Vergleich zum Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Enzym die umgesetzte Menge Substrat bzw. die gebildete Menge Produkt reduziert.

10 Unter einer reduzierten Aktivität wird vorzugsweise die teilweise oder im wesentlichen vollständige, auf unterschiedliche zellbiologische Mechanismen beruhende Unterbindung oder Blockierung der Funktionalität dieses Enzyms in einem Mikroorganismus verstanden.

15 Eine Reduzierung der Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung eines Enzyms bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen des Enzyms (d.h. fehlende Nachweisbarkeit der entsprechenden Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit des Enzyms). Vorzugsweise wird die Aktivität im Mikroorganismus im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der entsprechenden Aktivität.

20

25

Die Aktivität bestimmter Enzyme in genetisch veränderten Mikroorganismen sowie im Wildtyp und damit die Erhöhung oder Reduzierung der Enzymaktivität lassen sich nach bekannten Verfahren, wie beispielsweise Enzymassays ermitteln.

30 Beispielsweise wird unter einer Pyruvatcarboxylase ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Pyruvat in Oxaloacetat umzuwandeln.

35 Dementsprechend wird unter einer Pyruvatcarboxylase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase umgesetzte Menge Pyruvat bzw. gebildete Menge Oxaloacetat verstanden.

40 Bei einer erhöhten Pyruvatcarboxylase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Pyruvatcarboxylase die umgesetzte Menge Pyruvat bzw. die gebildete Menge Oxaloacetat erhöht.

Vorzugsweise beträgt diese Erhöhung der Pyruvatcarboxylase-Aktivität mindestens 5 %, weiter bevorzugt mindestens 20 %, weiter bevorzugt mindestens 50 %, weiter bevorzugt mindestens 100 %, bevorzugter mindestens 300 %, noch bevorzugter mindestens 500 %, insbesondere mindestens 600 % der Pyruvatcarboxylase -Aktivität des Wildtyps.

Weiterhin wird beispielsweise unter einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die Enzymaktivität einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase verstanden.

Unter einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase wird ein Protein verstanden, das die enzymatische Aktivität aufweist, Oxaloacetat in Phosphoenolpyruvat umzuwandeln.

Dementsprechend wird unter Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität die in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. gebildete Menge Phosphoenolpyruvat verstanden.

Bei einer reduzierten Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität gegenüber dem Wildtyp wird somit im Vergleich zum Wildtyp in einer bestimmten Zeit durch das Protein Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase die umgesetzte Menge Oxaloacetat bzw. die gebildete Menge Phosphoenolpyruvat reduziert.

Eine Reduzierung der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität umfasst eine mengenmäßige Verringerung einer Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase bis hin zu einem im wesentlichen vollständigen Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (d.h. fehlende Nachweisbarkeit von Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität oder fehlende immunologische Nachweisbarkeit der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase). Vorzugsweise wird die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp um mindestens 5 %, weiter bevorzugt um mindestens 20 %, weiter bevorzugt um mindestens 50 %, weiter bevorzugt um 100 % reduziert. Insbesondere meint "Reduzierung" auch das vollständigen Fehlen der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase - Aktivität.

Die zusätzliche Erhöhung von Aktivitäten kann durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Ausschalten von hemmenden Regulationsmechanismen auf Expressions- und Proteinebene oder durch Erhöhung der Genexpression von Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp.

Die Erhöhung der Genexpression der Nukleinsäuren kodierend die vorstehend beschriebenen Proteine gegenüber dem Wildtyp kann ebenfalls durch verschiedene Wege erfolgen, beispielsweise durch Induzierung des Gens durch Aktivatoren oder wie

vorstehend beschrieben durch Erhöhung der Promotoraktivität oder Erhöhung der Expressionsaktivität oder durch Einbringen von einer oder mehrerer Genkopien in den Mikroorganismus.

5 Unter Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure codierend ein Protein wird erfundungsgemäß auch die Manipulation der Expression der Mikroorganismus eigenen, endogenen Proteine verstanden.

10 Dies kann beispielsweise, wie vorstehend beschrieben durch Veränderung der Promotor- und/oder Expressionseinheits-Sequenzen der Gene erreicht werden. Eine solche Veränderung, die eine erhöhte Expressionsrate des Gens zur Folge hat, kann beispielsweise durch Deletion oder Insertion von DNA Sequenzen erfolgen.

15 Es ist, wie vorstehend beschrieben, möglich, die Expression der endogenen Proteine durch die Applikation exogener Stimuli zu verändern. Dies kann durch besondere physiologische Bedingungen, also durch die Applikation von Fremdstoffen erfolgen.

Zur Erzielung einer Erhöhung der Genexpression kann der Fachmann weitere unterschiedliche Maßnahmen einzeln oder in Kombination ergreifen. So kann beispielsweise 20 die Kopienzahl der entsprechenden Gene erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion oder die Ribosomenbindungsstelle, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich, die Expression im Verlaufe der fermentativen Produktion zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der mRNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins 25 ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte können entweder in Plasmiden mit unterschiedlicher Kopienzahl vorliegen oder im Chromosom integriert und amplifiziert sein. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht 30 werden.

Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Biotechnology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 35 (1991)), in der Europäischen Patentschrift 0472869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Biotechnology 9, 84-87 (1991)), bei Remscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60,126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Mumbres et al. (Gene 134, 15-24 (1993)), in der japanischen Offenlegungsschrift JP-A-40 10-229891, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195

(1998)), bei Makrides (Microbiological Reviews 60 : 512-538 (1996) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

Weiterhin kann es für die Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-

5 Lysin, L-Methionin und L-Threonin, vorteilhaft sein, neben der Expression bzw. Verstärkung eines Gens unerwünschte Nebenreaktionen auszuschalten (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms", in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982).

10 In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Erhöhung der Genexpression einer Nukleinsäure kodierend eines der vorstehend beschriebenen Proteine durch Einbringen von mindestens einer Nukleinsäure kodierend ein entsprechendes Protein in den Mikroorganismus. Das Einbringen der Nukleinsäure kann chromosomal oder extrachromosomal erfolgen, also durch Erhöhung der Kopienzahl auf dem Chromosom und oder

15 eine Kopie des Gens auf einem sich replizierenden Plasmid in dem Wirtsmikroorganismus.

Vorzugsweise erfolgt das Einbringen der Nukleinsäure, beispielsweise in Form einer Expressionskassete, enthaltend die Nukleinsäure, chromosomal, insbesondere durch

20 die vorstehend beschriebene SacB-Methode.

Dazu kann prinzipiell jedes Gen, das eines der vorstehend beschriebenen Proteine kodiert verwendet werden.

25 Bei genomischen Nukleinsäure-Sequenzen aus eukaryontischen Quellen, die Introns enthalten, sind für den Fall das der Wirtsmikroorganismus nicht in der Lage ist oder nicht in die Lage versetzt werden kann, die entsprechenden Proteine zu exprimieren, bevorzugt bereits prozessierte Nukleinsäuresequenzen, wie die entsprechenden cDNAs zu verwenden.

30 Beispiele für die entsprechenden Gene sind in Tabelle 1 und 2 aufgelistet.

Vorzugsweise erfolgt die Reduzierung der vorstehend beschriebenen Aktivitäten in Mikroorganismen durch mindestens eines der nachfolgenden Verfahren:

35

- Einbringen mindestens einer sense-Ribonukleinsäuresequenz zur Induktion einer Kosuppression oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette

- Einbringen mindestens eines DNA- oder Protein-bindenden Faktors gegen das entsprechende -Gen, -RNA oder -Protein oder einer dessen Expression gewährleistenden Expressionskassette

5 • Einbringen mindestens einer den RNA-Abbau bewirkenden viralen Nukleinsäuresequenz oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette

10 • Einbringen mindestens eines Konstruktes zur Erzeugung eines Funktionsverlustes, wie beispielsweise die Generierung von Stopp-Kodons oder eine Verschiebungen im Leseraster, an einem Gen beispielsweise durch Erzeugung einer Insertion, Deletion, Invasion oder Mutation in einem Gen. Bevorzugt können Knockout-Mutanten mittels gezielter Insertion in das gewünschte Zielgen durch homologe Rekombination oder Einbringen von sequenzspezifischen Nukleasen gegen das Zielgen generiert werden.

15 • Einbringen eines Promotors mit reduzierter Promotoraktivität oder einer Expressionseinheit mit reduzierter Expressionsaktivität.

Dem Fachmann ist bekannt, dass auch weitere Verfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung zur Reduzierung seiner Aktivität oder Funktion eingesetzt werden können. Beispielsweise kann auch das Einbringen einer dominant-negativen Variante eines Proteins oder einer deren Expression gewährleistenden Expressionskassette vorteilhaft sein.

25 Dabei kann jedes einzelne dieser Verfahren eine Verminderung der Proteinmenge, mRNA-Menge und/oder Aktivität eines Proteins bewirken. Auch eine kombinierte Anwendung ist denkbar. Weitere Methoden sind dem Fachmann bekannt und können die Behinderung oder Unterbindung der Prozessierung des Proteins, des Transports des Proteins oder dessen mRNA, Hemmung der Ribosomenanlagerung, Hemmung des 30 RNA-Spleißens, Induktion eines RNA abbauenden Enzyms und/oder Hemmung der Translationselongation oder -termination umfassen.

Im erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten wird vorzugsweise dem Kultivierungsschritt der genetisch veränderten Mikroorganismen ein 35 Isolieren von biosynthetischen Produkten aus den Mikroorganismen oder/oder aus der Fermentationsbrühe angeschlossen. Diese Schritte können gleichzeitig und/oder vorzugsweise nach dem Kultivierungsschritt stattfinden.

Die erfindungsgemäßen genetisch veränderten Mikroorganismen können kontinuierlich 40 oder diskontinuierlich im batch- Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulauf-

verfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zur Produktion von biosynthetischen Produkten, insbesondere L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozeßtechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) zu finden.

Das zu verwendende Kulturmedium hat in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Stämme zu genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods für General Bacteriology" der American Society für Bacteriology (Washington D. C., USA, 1981) enthalten.

Diese erfindungsgemäß einsetzbaren Medien umfassen gewöhnlich eine oder mehrere Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganische Salze, Vitamine und/oder Spurenelemente.

Bevorzugte Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Mono-, Di- oder Polysaccharide. Sehr gute Kohlenstoffquellen sind beispielsweise Glucose, Fructose, Mannose, Galactose, Ribose, Sorbose, Ribulose, Lactose, Maltose, Saccharose, Raffinose, Stärke oder Cellulose. Man kann Zucker auch über komplexe Verbindungen, wie Melassen, oder andere Nebenprodukte der Zucker-Raffinierung zu den Medien geben. Es kann auch vorteilhaft sein, Gemische verschiedener Kohlenstoffquellen zuzugeben. Andere mögliche Kohlenstoffquellen sind Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnußöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure oder Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin, Methanol oder Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure oder Milchsäure.

Stickstoffquellen sind gewöhnlich organische oder anorganische Stickstoffverbindungen oder Materialien, die diese Verbindungen enthalten. Beispielhafte Stickstoffquellen umfassen Ammoniak-Gas oder Ammoniumsalze, wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat oder Ammoniumnitrat, Nitrat, Harnstoff, Aminosäuren oder komplexe Stickstoffquellen, wie Maisquellwasser, Sojamehl, Sojaprotein, Hefeextrakt, Fleischextrakt und andere. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden.

Anorganische Salzverbindungen, die in den Medien enthalten sein können, umfassen die Chlorid-, Phosphor- oder Sulfatsalze von Calcium, Magnesium, Natrium, Kobalt, Molybdän, Kalium, Mangan, Zink, Kupfer und Eisen

Als Schwefelquelle für die Herstellung von Feinchemikalien, insbesondere von Methionin, können anorganische Verbindungen wie beispielsweise Sulfate, Sulfite, Dithionite, Tetrathionate, Thiosulfate, Sulfide aber auch organische Schwefelverbindungen, wie Mercaptane und Thiole, verwendet werden.

5

Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden.

10 Chelatbildner können zum Medium gegeben werden, um die Metallionen in Lösung zu halten. Besonders geeignete Chelatbildner umfassen Dihydroxyphenole, wie Catechol oder Protocatechuat, oder organische Säuren, wie Citronensäure.

15 Die erfindungsgemäß eingesetzten Fermentationsmedien enthalten üblicherweise auch andere Wachstumsfaktoren, wie Vitamine oder Wachstumsförderer, zu denen beispielsweise Biotin, Riboflavin, Thiamin, Folsäure, Nikotinsäure, Panthothenat und Pyridoxin gehören. Wachstumsfaktoren und Salze stammen häufig von komplexen Medienkomponenten, wie Hefeextrakt, Melassen, Maisquellwasser und dergleichen. Dem Kulturmedium können überdies geeignete Vorstufen zugesetzt werden. Die genaue
20 Zusammensetzung der Medienverbindungen hängt stark vom jeweiligen Experiment ab und wird für jeden spezifischen Fall individuell entschieden. Information über die Medienoptimierung ist erhältlich aus dem Lehrbuch "Applied Microbiol. Physiology, A Practical Approach" (Hrsg. P.M. Rhodes, P.F. Stanbury, IRL Press (1997) S. 53-73, ISBN 0 19 963577 3). Wachstumsmedien lassen sich auch von kommerziellen Anbietern beziehen, wie Standard 1 (Merck) oder BHI (Brain heart infusion, DIFCO) und dergleichen.

25 Sämtliche Medienkomponenten werden, entweder durch Hitze (20 min bei 1,5 bar und 121°C) oder durch Sterilfiltration, sterilisiert. Die Komponenten können entweder zusammen oder nötigenfalls getrennt sterilisiert werden. Sämtliche Medienkomponenten können zu Beginn der Anzucht zugegen sein oder wahlfrei kontinuierlich oder charakterweise hinzugegeben werden.

30 Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise zwischen 15°C und 45°C, vorzugsweise bei 25°C bis 40°C und kann während des Experiments konstant gehalten oder verändert werden. Der pH-Wert des Mediums sollte im Bereich von 5 bis 8,5, vorzugsweise um 7,0 liegen. Der pH-Wert für die Anzucht lässt sich während der Anzucht durch Zufügung von basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak bzw. Ammoniakwasser oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure kontrollieren. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel,

wie z. B. Fettsäurepolyglykolester, eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe, wie z. B. Antibiotika, hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten, werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen, wie z. B. Umgebungsluft, in die

5 Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt, bis sich ein Maximum des gewünschten Produktes gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

10 Die so erhaltenen Fermentationsbrühen haben üblicherweise eine Trockenmasse von 7,5 bis 25 Gew.-%.

Vorteilhaft ist außerdem auch, wenn die Fermentation zumindest am Ende, insbesondere jedoch über mindestens 30% der Fermentationsdauer zuckerlimitiert gefahren

15 wird. Das heißt, dass während dieser Zeit die Konzentration an verwertbarem Zucker im Fermentationsmedium auf 0 bis 3 g/l gehalten, beziehungsweise abgesenkt wird.

Die Isolierung von biosynthetischen Produkten aus der Fermentationsbrühe und/oder den Mikroorganismen erfolgt in an sich bekannter Weise entsprechend den physikalisch-chemischen Eigenschaften des biosynthetischen Wertprodukts und den biosynthetischen Nebenprodukten.

20 Die Fermentationsbrühe kann anschließend beispielsweise weiterverarbeitet werden. Je nach Anforderung kann die Biomasse ganz oder teilweise durch Separationsmethoden, wie z. B. Zentrifugation, Filtration, Dekantieren oder einer Kombination dieser Methoden aus der Fermentationsbrühe entfernt oder vollständig in ihr belassen werden.

25 Anschließend kann die Fermentationsbrühe mit bekannten Methoden, wie z. B. mit Hilfe eines Rotationsverdampfers, Dünnschichtverdampfers, Fallfilmverdampfers,

30 durch Umkehrosmose, oder durch Nanofiltration, eingedickt beziehungsweise aufkonzentriert werden. Diese aufkonzentrierte Fermentationsbrühe kann anschließend durch Gefriertrocknung, Sprühtrocknung, Sprühgranulation oder durch anderweitige Verfahren aufgearbeitet werden.

35 Es ist aber auch möglich die biosynthetischen Produkte, insbesonder L-Lysin, L-Methionin und L-Threonin, weiter aufzureinigen. Hierzu wird die produkthaltige Brühe nach dem Abtrennen der Biomasse einer Chromatographie mit einem geeigneten Harz unterworfen, wobei das gewünschte Produkt oder die Verunreinigungen ganz oder teilweise auf dem Chromatographieharz zurückgehalten werden. Diese Chromatographieschritte können nötigenfalls wiederholt werden, wobei die gleichen oder ande-

40

re Chromatographieharze verwendet werden. Der Fachmann ist in der Auswahl der geeigneten Chromatographieharze und ihrer wirksamsten Anwendung bewandert. Das gereinigte Produkt kann durch Filtration oder Ultrafiltration konzentriert und bei einer Temperatur aufbewahrt werden, bei der die Stabilität des Produktes maximal ist.

5

Die biosynthetischen Produkte können in unterschiedlichen Formen anfallen, beispielsweise in Form ihrer Salze oder Ester.

Die Identität und Reinheit der isolierten Verbindung(en) kann durch Techniken des
10 Standes der Technik bestimmt werden. Diese umfassen Hochleistungs-
Flüssigkeitschromatographie (HPLC), spektroskopische Verfahren, Färbeverfahren,
Dünnschichtchromatographie, NIRS, Enzymtest oder mikrobiologische Tests. Diese
Analyseverfahren sind zusammengefaßt in: Patek et al. (1994) Appl. Environ. Microbiol. 60:133-140; Malakhova et al. (1996) Biotehnologiya 11 27-32; und Schmidt et al.
15 (1998) Bioprocess Engineer. 19:67-70. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry
(1996) Bd. A27, VCH: Weinheim, S. 89-90, S. 521-540, S. 540-547, S. 559-566, 575-
581 und S. 581-587; Michal, G (1999) Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry
and Molecular Biology, John Wiley and Sons; Fallon, A. et al. (1987) Applications of
HPLC in Biochemistry in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,
20 Bd. 17.

Die Erfindung wird nun anhand der folgenden nicht-limitierenden Beispiele näher beschrieben:

25 Beispiel 1

Konstruktion von Plasmid pCIS lysC

Im ersten Schritt der Stammkonstruktion wurde ein allelischer Austausch des lysC Wildtypgens in Corynebakterium glutamicum ATCC13032 durchgeführt. Dabei wurde
30 im lysC Gen ein Nukleotidaustausch durchgeführt, so daß im resultierenden Protein die Aminosäure Thr an der Position 311 durch ein Ile ausgetauscht wurde. Ausgehend von der chromosomal DNA aus ATCC13032 als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:5 und SEQ ID NO:6 lysC mit Hilfe des Pfu-Turbo PCR Systems (Stratagene USA) nach Angaben des Herstellers amplifiziert.

35

SEQ ID NO:5

5'-GAGAGAGAGACCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC -3'

SEQ ID NO:6

40 5'-CTCTCTGTCGACGAATTCAATCTTACGGCCTG-3'

Chromosomal DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Das amplifizierte Fragment wird an seinem 5'-Ende von einem Sall Restriktions-

5 schnitt und an seinem 3'-Ende von einem MluI Restriktionsschnitt flankiert. Vor der Klonierung wurde das amplifizierte Fragment durch diese beiden Restriktionsenzyme verdaut und mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aufgereinigt.

10 Das erhaltenen Polynukleotid wurde über die Sall und MluI Restriktionsschnitte in pCLIK5 MCS integrativ SacB im folgenden pCIS genannt (SEQ ID NO: 7) kloniert und in *E.coli* XL-1 blue transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht. Das Plasmid wurden isoliert und durch Sequenzierung die erwartete Nukleotidsequenz bestätigt. Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet. Das

15 erhaltene Plasmid pCIS lysC ist als SEQ ID NO:8 aufgeführt.

20

Beispiel 2

Mutagenese des lysC Gens aus *C. glutamicum*

25 Die gerichtete Mutagenese des lysC Gens aus *C. glutamicum* wurde mit dem Quick-Change Kit (Fa. Stratagene/USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Mutagenese wurde im Plasmid pCIS lysC, SEQ ID NO:8 durchgeführt. Für den Austausch von thr 311 nach 311ile mit Hilfe der Quickchange Methode (Stratagene) wurden folgende Oligonukleotidprimer synthetisiert:

30

SEQ ID NO:9

5'-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTGTTCCG -3'

SEQ ID NO:10

35 5'-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG -3'

Der Einsatz dieser Oligonukleotidprimer in der Quickchange Reaktion führt in dem lysC Gen SEQ ID NO:11 zu einem Austausch des Nukleotids in Position 932 (von C nach T). Der resultierende Aminosäureaustausch Thr311Ile im lysC Gen wurde nach Trans-

40 formation in *E.coli* XL1-blue und Plasmidpräparation durch ein Sequenzierungsreaktio-

nen bestätigt. Das Plasmid erhielt die Bezeichnung pCIS lysC thr311ile und ist als SEQ ID NO:12 aufgeführt.

Das Plasmid pCIS lysC thr311ile wurde in *C. glutamicum* ATCC13032 mittels Elektroporation wie bei Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 beschrieben, transformiert. Modifikationen des Protokolls sind in DE 10046870 beschrieben. Die chromosomal Anordnung des lysC-Lokus einzelner Transformanten wurde mit Standardmethoden durch Southernblot und Hybridisierung wie in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben, überprüft. Dadurch wurde sichergestellt, daß es sich bei den Transformanten um solche handelt, die das transformierte Plasmid durch homologe Rekombination am lysC-Lokus integriert haben. Nach Wachstum solcher Kolonien über Nacht in Medien, die kein Antibiotikum enthalten, werden die Zellen auf ein Saccharose-CM-Agarmedium (10% Saccharose, 10 g/l Glucose; 2,5 g/l NaCl; 2 g/l Harnstoff, 10 g/l Bacto Peptone (Fa. Difco); 10 g/l Hefeextrakt, 22,0 g/L Agar (Difco)) ausplattiert und bei 30°C für 24 Stunden inkubiert.

Da das im Vektor pCIS lysC thr311ile enthaltende sacB Gen Saccharose in ein toxisches Produkt umwandelt, können nur solche Kolonien anwachsen, die das sacB Gen durch einen zweiten homologen Rekombinationsschritt zwischen dem Wildtyp lysC Gen und dem mutierten Gen lysC thr311ile deletiert haben. Während der homologen Rekombination kann entweder das Wildtyp Gen, oder das mutierte Gen zusammen mit dem sacB Gen deletiert werden. Wenn das sacB Gen zusammen mit dem Wildtyp Gen entfernt wird, resultiert eine mutierte Transformante.

Anwachsende Kolonien wurden gepickt, und auf eine Kanamycin-sensitiven Phänotyp hin untersucht. Klone mit deletiertem SacB Gen müssen gleichzeitig Kanamycin sensitivs Wachstumsverhalten zeigen. Solche Kan-sensitiven Klone wurde im einem Schüttelkolben auf ihre Lysin-Produktivität hin untersucht (siehe Beispiel 6). Zum Vergleich wurde der nicht behandelte *C. glutamicum* ATCC13032 angezogen. Klone mit einer gegenüber der Kontrolle erhöhten Lysin-Produktion wurden selektiert, chromosomal DNA gewonnen und der entsprechende Bereich des lysC Gens durch eine PCR-Reaktion amplifiziert und sequenziert. Ein solcher Klon mit der Eigenschaft erhöhter Lysin-Synthese und nachgewiesener Mutation in lysC an der Stelle 932 wurde mit ATCC13032 lysC^{fr} bezeichnet.

Beispiel 3

Herstellung eines Integrationsplasmids zur Überexpression des lysC-Gens mit Hilfe der heterologen Expressionseinheit Psod (SEQ. ID. NO. 2)

Zur Amplifizierung der Expressionseinheit des Gens, das für die Superoxiddimutase kodiert, wurden die folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ ID 13:

5 sod8: 5'- accctggcgaaaccctgagtgc -3'

SEQ ID 14:

sod1: 5'- tacgaccaggccacggtaaaaaatccttcgtaggttccgcaccgagcatatacatcttg-3'

10 Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC 13032 eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 657 bp entsprach.

15 Zur Amplifizierung des Gens, das für die Aspartokinase kodiert, wurden sie folgenden Oligonukleotide definiert.

SEQ ID 15

lysC2: 5'- cctacgaaaggatttttacccgtggccctggtcgtacag-3'

20 SEQ ID 16:

lysC6: 5'- gattagtggAACCTCGTCGTC-3'

Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 lysC^{fr} eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1638 bp entsprach.

Die Primer sod1 und ask2 enthalten eine überlappende Sequenz und sind an ihren 5'-Enden homolog zueinander.

30 Die oben erhaltenen PCR-Produkte wurden als Template für eine weitere PCR eingesetzt, in der die folgenden Primer genutzt wurden.

SEQ ID 17:

sod4: 5'- gcggcgcaggatttctaa-3'

35

SEQ ID 18:

lysC4: 5'- tcggttgcctgagtaatgtct-3'

Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 1811 bp entsprach. Diese Psod/lysC-Fusion wurde dann in den Vektor

pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. In einem weiteren Schritt wurde die Fusion Psod/lysC aus dem Plasmid pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) als 1773 bp EcoRI-Fragment in den Integrationsvektor pK19 mob sacB SEQ ID NO 19 kloniert, der zuvor mit der Restriktionsendonuklease EcoRI geschnitten worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pk19 mob sacB Psod lysC bezeichnet.

Zur Amplifikation eines 5'-Bereiches des lysC-Gens wurden folgende Oligonukleotide definiert:

10 SEQ ID 20:
lysC23: 5'- caccgcggcttggacatcactgctac-3'

SEQ ID 21:
lysC24: 5'- cctggggcttagcggtgcgtctca-3'

15 Die Primer wurden in eine PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. glutamicum* eingesetzt. Mit diesem Ansatz konnte ein DNA-Fragment amplifiziert werden, das der erwarteten Größe von 674 bp entsprach. Dieses DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) kloniert. Ein 787 bp

20 Spel/XbaI-Fragment wurde dann anschließend in den Vektor pK19 mob sacB Psod lysC kloniert, der zuvor mit dem Restriktionsenzym NheI verdaut worden war. Das resultierende Plasmid wurde mit pK19 mob sacB Psod lysC + US (SEQ ID 22) bezeichnet. Bis zu diesem Schritt wurden alle Klonierungen in *Escherichia coli* XL-1 Blue (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt.

25 Mit dem Transformationsplasmid pK19 mobsacB Psod lysC + US wurde dann *E. coli* Mn522 (Firma Stratagene, Amsterdam, Niederlande) zusammen mit dem Plasmid pTc15AcglM nach Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 transformiert. Das Plasmid pTc15AcglM ermöglicht die Methylierung von DNA nach dem

30 Methylierungsmuster von *Corynebacterium glutamicum* (DE 10046870). Durch diesen Schritt wird eine anschließende Elektroporation von *Corynebacterium glutamicum* mit dem Integrationsplasmid pK19 mob sacB Psod lysC + US ermöglicht. Aus dieser Elektroporation und der nachfolgenden Selektion auf CM-Platten mit Kanamycin (25 µg/ml) wurden mehrere Transkonjuganten erhalten. Zur Selektion auf das zweite Re-

35 kombinationsereignis, das zur Excision des Vectors samt dem lysC-Promotor und dem lysC-Gen führen soll, wurden diese Transkonjuganten in CM-Medium über Nacht ohne Kanamycin angezogen und anschließend zur Selektion auf CM-Platten mit 10% Saccharose ausplattiert. Das auf dem Vektor pK19 mob sacB vorhandenen sacB-Gen kodiert für das Enzym Laevansucrase und führt bei Wachstum auf Saccharose zur Synthese von Laevan. Da Laevan für *C. glutamicum* toxisch ist, können nur *C. glutamicum*

40

Zellen, die das Integrationsplasmid durch den zweiten Rekombinationsschritt verloren haben, auf Saccharose-haltigem Medium wachsen (Jäger et al., Journal of Bacteriology 174 (1992) 5462-5466). 100 Saccharose-resistente Klone wurden auf ihre Kanamycin-Sensitivität hin überprüft. Für 57 der getesteten Klone konnte neben der Resistenz gegenüber Saccharose auch eine Sensitivität gegenüber Kanamycin nachgewiesen werden. Ob auch der gewünschte Austausch der natürlichen Expressionseinheit durch die Psod-Expressionseinheit erfolgt war, wurde mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) überprüft. Für diese Analyse wurde chromosomal DNA aus dem Ausgangsstamm und 20 Klonen isoliert. Hierzu wurden die jeweiligen Klone mit einem Zahnstocher von der Agarplatte abgenommen und in 100 µl H₂O suspendiert und 10 min bei 95°C aufgekocht. Jeweils 10 µl der erhaltenen Lösung wurden als Template in die PCR eingesetzt. Als Primer wurden Oligonukleotide verwendet, die zur Psod-Expressionseinheit und dem lysC-Gen homolog sind. Die PCR-Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Vorabdenaturierung: 5 min bei 95°C; Denaturierung 30 sec bei 95°C; 15 Hybridisierung 30 sec bei 55°C; Amplifizierung 2 min bei 72°C; 30 Zyklen,; End-Exension 5 min bei 72°C. Im Ansatz mit der DNA des Ausgangsstammes konnte durch Wahl der Oligonukleotide kein PCR-Produkt entstehen. Nur bei Klonen, die durch die 2. Rekombination den Austausch des natürlichen Promotors (PlysC) gegen Psod vollzogen haben, wurde ein Bande mit einer Größe von 340 bp erwartet. Insgesamt waren von den getesteten 20 Klonen 2 Klonen positiv.

Beispiel 4

Aspartokinase (lysC) Assay

25 C. glutamicum Stämme, die entweder eine chromosomal Copy des lysC^{fbr}-Gens mit dem natürlichen Promotor oder eine chromosomal Copie des Psod lysC^{fbr} Konstruktes enthielten, wurden in MMA-Medium (20 g/l Glucose, 10 g/l (NH₄)₂SO₄, 0,5 g KH₂PO₄, 0,5 g K₂HPO₄, 2,5 g Harnstoff, 5 g NaCl, 400 mg MgSO₄ + 7H₂O, 10 mg FeSO₄ * 7H₂O, MnSO₄ * 6 H₂O, 100 mg L-Leucin, 100 mg L-Cystein, 250 mg Pantothensäure, 5 30 mg Nicotinamid, 100 µg Biotin, 200 µg Thiamin, 15 g MOPS, pH6,8) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 8 angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in kalten Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD₆₀₀ von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfzentrifuge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

Die enzymatische Aktivität der Aspartokinase wurde wie folgt durchgeführt. Reaktionsansätze von 1 ml mit 100 mM Tris-HCl (pH 8,0), 10 mM MgCl₂, 600 mM Hydroxylamin-HCl (pH 73,0 mit 10 N KOH), 4 mM ATP, 200 mM Aspartat (Natriumsalz) und H₂O ad 1 ml wurden für 10 min bei 30°C inkubiert. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysat gestartet und bei 30°C für 30 min inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 1 ml der Stoplösung (10% Eisenchlorid, 3,3 % Trichloressigsäure, 0,7 N NaCl) zum Reaktionsgemisch hinzugegeben. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde OD₅₄₀ des Überstandes gemessen. 1 Unit entspricht dabei 1 nmol Aspartat Hydroxamat, das pro mg Protein pro Minute gebildet wird.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1a gezeigt.

Tabelle 1a

15

Stamm	spezifische Aktivität [nmol/mg/min]
ATCC 13032 lysC ^{fbr}	19,35
ATCC 13032 Psod lysC ^{fbr}	41,22

Die Aktivität der Aspartokinase konnte durch die Integration des Psod lysC Konstruktes in das Chromosom verdoppelt werden.

20 Beispiel 5

Produktion von Lysin

Zur Untersuchung der Auswirkung des Psod lysC Konstruktes auf die Lysin-Produktion wurde der Stämm ATCC13032, ATCC13032 lysC^{fbr} und ATCC13032 Psod lysC^{fbr} auf CM-Platten (10,0 g/L D-glucose, 2,5 g/L NaCl, 2,0 g/L Harnstoff, 10,0 g/L Bacto Pepton (Difco), 5,0 g/L Yeast Extract (Difco), 5,0 g/L Beef Extract (Difco), 22,0 g/L Agar (Difco), autoklaviert (20 min. 121°C)) für 2 Tag bei 30°C angezogen. Anschließend wurden die Zellen von der Platte abgekratzt und in Saline resuspendiert. Für die Hauptkultur wurden 10 ml Medium I und 0,5 g autoklaviertes CaCO₃ (Riedel de Haen) in einem 100 ml Erlenmeyerkolben mit der Zellsuspension bis zu einer OD₆₀₀ von 1,5 beimpft und für 39h auf einem vom Typ Infors AJ118 (Fa. Infors, Bottmingen, Schweiz) bei 220 upm inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration des in das Medium ausgeschiedene Lysin bestimmt.

35 Medium I:

40g/l Saccharose

60g/l Melasse (auf 100% Zuckergehalt berechnet)
 10g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 0.4g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
 0.6g/l KH_2PO_4

5 0.3mg/l Thiamin*HCl
 1mg/l Biotin (aus einer 1 mg/ml steril filtrierten Stammlösung die mit NH_4OH auf pH 8,0 eingestellt wurde)
 2mg/l FeSO_4
 2mg/l MnSO_4

10 mit NH_4OH auf pH 7,8 eingestellt, autoklaviert (121°C , 20 min).
 zusätzlich wird Vitamin B12 (Hydroxycobalamin Sigma Chemicals) aus einer Stammlösung (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$, steril filtriert) bis zu einer Endkonzentration von 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ zugegeben

Die Bestimmung der Aminosäurekonzentration erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie nach Agilent auf einer Agilent 1100 Series LC System HPLC. Eine Vorsäulenderivatisierung mit Ortho-Pthalaldehyd erlaubt die Quantifizierung der gebildeten Aminosäuren, die Auf trennung des Aminosäuregemisch findet auf einer Hypersil AA-Säule (Agilent) statt.

Das Ergebnis der Untersuchung ist in Tabelle 2a dargestellt

20

Tabelle 2a

Stamm	L-Lysin (g/l)
ATCC13032	0
ATCC13032 lysC ^{fbr}	10,15
ATCC13032 Psod lysC ^{fbr}	12,67

Beispiel 6

25 Herstellung des Vektors pCLiK5MCS

Zunächst wurden Ampicillinresistenz und Replikationsursprung des Vektors pBR322 mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:23 und SEQ ID NO:24 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert.

30

SEQ ID NO:23

5'-CCCGGGATCCGCTAGCGGCGGCCGGCCGGGTGTGAAATACCGCACA
 G-3'

35 SEQ ID NO:24

5'-TCTAGACTCGAGCGGCCGCGCCGGCCTTAAATTGAAGACGAAAGGGCCTC
G-3'

Neben den zu pBR322 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer

5 SEQ ID NO:23 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen SmaI, BamHI, NheI und Ascl und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:24 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, XhoI, NotI und DraI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,1 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die stumpfen Enden des DNA-Fragmentes wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers miteinander ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben (1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

10

15

20

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK1.

25 Ausgehend vom Plasmid pWLT1 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:25 und SEQ ID NO:26 eine Kanamycin-Resistenzcassette amplifiziert.

SEQ ID NO:25:

30 5'-GAGATCTAGACCCGGGATCCGCTAGCGGGCTGCTAAAGGAAGCGGA-3'

SEQ ID NO:26

5'-GAGAGGCGCGCCGCTAGCGTGGGCGAAGAACTCCAGCA-3'

35 Neben den zu pWLT1 komplementären Sequenzen, enthält der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 25 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen XbaI, SmaI, BamHI, NheI und der Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:26 in 5'-3' Richtung die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Ascl und NheI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla,

40

USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 1,3 kb wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Das DNA-Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und Ascl (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK1 wurde ebenfalls mit den Restriktionsendonukleasen XbaI und Ascl geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,1kb) mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Ampicillin (50µg/ml) und Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK2.

Der Vektor pCLiK2 wurde mit der Restriktionsendonuklease DraI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde ein ca. 2,3 kb großes Vektorfragment mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers religiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK3.

Ausgehend vom Plasmid pWLQ2 (Liebl et al., 1992) als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO:27 und SEQ ID NO:28 der Replikationsursprung pHM1519 amplifiziert.

5 SEQ ID NO:27:

5'-GAGAGGGCGGCCGCGCAAAGTCCCGCTTCGTGAA-3'

SEQ ID NO:28:

5'-GAGAGGGCGGCCGCTCAAGTCGGTCAAGCCACGC-3'

10

Neben den zu pWLQ2 komplementären Sequenzen, enthalten die Oligonukleotidprimer SEQ ID NO:27 und SEQ ID NO:28 Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease NotI. Die PCR Reaktion wurde nach Standardmethode wie Innis et al. (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press (1990)) mit PfuTurbo Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Das erhaltene DNA Fragment mit einer Größe von ungefähr 2,7 kb wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

15

Das DNA-Fragment wurde mit der Restriktionsendonuklease NotI (New England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und im Anschluß daran erneut mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Der Vektor pCLiK3 wurde ebenfalls mit der Restriktionsendonuklease NotI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 2,3kb) mit dem

20

GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers mit dem geschnittenen PCR Fragment ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring

25

Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

30

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5.

Für die Erweiterung von pCLiK5 um eine „multiple cloning site“ (MCS) wurden die bei-
de synthetischen, weitestgehend komplementären Oligonukleotide SEQ ID NO:29 und
SEQ ID NO:30, die Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen Swal, Xhol, AatI,
Apal, Asp718, MluI, NdeI, SphI, EcoRV, SalI, ClaI, BamHI, XbaI und SmaI enthalten,
5 durch gemeinsames erhitzen auf 95°C und langsames abkühlen zu einem dop-
pelsträngigen DNA-Fragment vereinigt.

SEQ ID NO:29:

10 5'-TCGAATTAAATCTCGAGAGGCCTGACGTCGGGCCGGTACCACGCGTCATAT
GACTAGTCGGACCTAGGGATATCGTCGACATCGATGCTCTGCGTTAATTAAAC
AATTGGGATCCTCTAGACCCGGGATTAAAT-3'

SEQ ID NO:30:

15 5'-GATCATTAAATCCCGGGTCTAGAGGATCCAATTGTTAATTACGCAGAAGAG
CATCGATGTCGACGATATCCCTAGGTCCGAACTAGTCATATGACGCGTGGTACCG
GGCCCGACGTCAGGCCTCTCGAGATTAAAT-3'

Der Vektor pCLiK5 wurde mit den Restriktionsendonuklease Xhol und BamHI (New
England Biolabs, Beverly, USA) geschnitten und mit alkalischer Phosphatase (I (Roche
20 Diagnostics, Mannheim)) nach Angaben des Herstellers dephosphoryliert. Nach E-
lektrrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel wurde der linearisierte Vektor (ca. 5,0 kb)
mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Frei-
burg) nach Angaben des Herstellers isoliert. Dieses Vektor-Fragment wurde mit Hilfe
des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Her-
25 stellers mit dem synthetischen Doppelsträngigen DNA-Fragment ligiert und der Ligati-
onsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Labo-
ratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue
Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen
wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox,
30 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Plasmid-DNA eines individuellen Klons wurde mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit
(Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers isoliert und über Restriktionsverdau
überprüft. Das so erhaltene Plasmid erhält den Namen pCLiK5MCS.

35 Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the Na-
tional Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzerreaktio-
nen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt
und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS ist als SEQ ID NO:31 aufgeführt.

Beispiel 7

Herstellung des Plasmids PmetA metA

5

Chromosomal DNA aus C. glutamicum ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimer SEQ ID NO 32 und SEQ ID NO 33, der chromosomal DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden, wie in Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press beschrieben, ein das metA Gen inklusice des nichkodierenden 5'-Bereichs amplifiziert.

SEQ ID NO 32

15 5'-GCGCGGTACCTAGACTCACCCAGTGCT -3'

und

SEQ ID NO 33

5'-CTCTACTAGTTAGATGTAGAACTCGATGT -3'

20 Das erhaltene DNA Fragment von ca. 1,3 kb Größe wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen Asp718 und Spel (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und das DNA Fragment mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit aufgereinigt.

25

Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 31 wurde mit den Restriktionsenzymen Asp718 und Spel geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit isoliert.

30 Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid 35 tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977)

40 Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt.

Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PmetA metA ist als SEQ ID NO 34: aufgeführt.

5

Beispiel 8

Herstellung des Plasmids pCLiK5MCS Psod metA

10 Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde nach Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 oder Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 präpariert. Mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 35 und SEQ ID NO 36, der chromosomal DNA als Template und Pfu Turbo Polymerase (Fa. Stratagene) wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Standardmethoden wie Innis et al. (1990)

15 PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press ein DNA Fragment von ca. 200 Basenpaaren aus dem nichtkodierenden 5'-Bereich (Region der Expressionseinheit) der Superoxiddismutase (Psod) amplifiziert.

SEQ ID NO 35

20 5'-GAGACTCGAGAGCTGCCATTATTCCGGG-3'

und

SEQ ID NO 36

5'-CCTGAAGGCGCGAGGGTGGGCATGGTAAAAAATCCTTCG -3'

25 Das erhaltene DNA Fragment wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Ausgehend vom Plasmid PmetA metA SEQ ID 34 als Template für eine PCR Reaktion wurde mit den Oligonukleotidprimern SEQ ID NO 37: und SEQ ID NO 38: ein Teil von

30 metA amplifiziert.

SEQ ID NO 37

5'-CCCACCCTCGCGCCTTCAG -3'

und

35 SEQ ID NO 38

5'-CTGGGTACATTGCGGCC -3'

Das erhaltene DNA Fragment von ungefähr 470 Basenpaaren wurde mit dem GFX™PCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gerei-

40 nigt.

In einer weiteren PCR Reaktion wurden die beiden oben erhaltenen Fragmente gemeinsam als Template eingesetzt. Durch die mit dem Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 36 eingebrachten, zu metA homologen Sequenzen, kommt es im Zuge der PCR-

5 Reaktion zu einer Anlagerung beider Fragmente aneinander und einer Verlängerung zu einem durchgehenden DNA-Strang durch die eingesetzte Polymerase. Die Standardmethode wurde dahingehend modifiziert, dass die verwendeten Oligonukleotidprimer SEQ ID NO: 35 und SEQ ID NO: 38 erst mit Beginn des 2. Zykluses dem Reaktionsansatz zugegeben wurden.

10

Das amplifizierte DNA Fragment von ungefähr 675 Basenpaaren wurde mit dem GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Im Anschluß daran wurde es mit den Restriktionsenzymen Xhol und Ncol (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten und geelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend 15 wurde das ca. 620 Basenpaar große DNA Fragment mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) aus der Agarose aufgereinigt. Das Plasmid PmetA metA SEQ ID NO 34: wurde mit den Restriktionsenzymen Ncol und Spel (Roche Diagnostics, Mannheim) gespalten. Nach geelektrophoretischer Auf trennung wurde ein ca. 0,7 kb großes metA Fragment mit GFXTMPCR, DNA and Gel 20 Band Purification Kit aus der Agarose aufgereinigt.

20

Der Vektor pClik5MCS SEQ ID NO: 31 wurde mit den Restriktionsenzymen Xhol und Spel (Roche Diagnostics, Mannheim) geschnitten und ein 5 kb großes Fragment nach elektrophoretischer Auftrennung mit GFXTMPCR, DNA and Gel Band Purification Kit 25 isoliert.

30

Das Vektorfragment wurde zusammen mit dem PCR-Fragment und dem metA-Fragment mit Hilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers ligiert und der Ligationsansatz nach Standardmethoden wie in Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, beschrieben(1989)), in kompetente E.coli XL-1Blue (Stratagene, La Jolla, USA) transformiert. Eine Selektion auf Plasmid tragende Zellen wurde durch das Ausplattieren auf Kanamycin (20µg/ml) haltigen LB Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) erreicht.

35

Die Präparation der Plasmid DNA wurde nach Methoden und mit Materialien der Fa. Quiagen durchgeführt. Sequenzierungsreaktionen wurden nach Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 durchgeführt. Die Sequenzierreaktionen wurden mittels ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und ausgewertet.

40

Das entstandene Plasmid pCLiK5MCS PSODmetA ist als SEQ ID NO 39: aufgeführt.

Beispiel 9

MetA-Aktivitäten

5

Der Stamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde jeweils mit den Plasmiden pClik5 MCS, pClik MCS PmetA metA, pCLiK5MCS Psod metA, nach der beschriebenen Methode (Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303) transformiert. Die Transformationsmischung wurde auf CM-Platten plattiert, die zusätzlich 20mg/l Kanamycin enthielten, um eine Selektion auf Plasmid-haltige Zellen zu erreichen. Erhaltene Kan-resistente Klone wurden gepickt und vereinzelt.

10 C. glutamicum Stämme, die eines dieser Plasmidkonstrukte enthielten, wurden in MMA-Medium ((40 g/l Saccharose, 20 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/l KH_2PO_4 , 1 g/l K_2HPO_4 , 15 0,25g/l $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 54 g Aces, 1 ml CaCl_2 (10 g/l), 1 ml Protocatechoat (300 mg/10 ml), 1 ml Spurenelementelösung (10 g/l $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g/l $\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g/l $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,2 g/l CuSO_4 , 0,02 g/l $\text{NiCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$), 100 $\mu\text{g}/\text{l}$ Vitamin B_{12} , 0,3 mg/l Thiamin, 1mM Leucin, 1 mg/l Pyridoxal HCl, 1 ml Biotin (100 mg/l), pH7,0) bei 30°C über Nacht angezogen. Die Zellen wurden bei 4°C abzentrifugiert und das zweimal mit 20 kaltem Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in kalten Tris-HCl-Puffer (0,1%, pH 8,0) aufgenommen und eine OD_{600} von 160 eingestellt. Für den Zellaufschluß wurden 1 ml dieser Zellsuspension in 2 ml Ribolyserröhrchen der Fa. Hybaid überführt und in einem Ribolyser der Fa. Hybaid bei einer Rotationseinstellung von 6,0 dreimal für jeweils 30 sec lysiert. Das Lysat wurde durch 30minütige Zentrifugation bei 15.000 rpm bei 4°C in einer Eppendorfzentrifuge geklärt und der Überstand in ein neues Eppendorfcup überführt. Der Proteingehalt 25 wurde nach Bradford, M.M. (1976) Anal. Biochem. 72:248-254 bestimmt.

30 Die Messung der enzymatischen Aktivität von MetA wurde wie folgt durchgeführt. Die Reaktionsansätze von 1 ml enthielten 100 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,5), 5mM MgCl_2 , 100 μM Acetyl CoA, 5mM L-Homoserine, 500 μM DTNB (Ellmans Reagenz) und Zelleextrakt. Der Test wurde durch Zugabe von dem jeweiligen Proteinlysat gestartet und bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde dann eine Kinetik bei 412 nm über 10 min aufgenommen.

35

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3a gezeigt.

Tabelle 3a

Stamm	spezifische Aktivität
-------	-----------------------

	[nMol/mg/min]
ATCC 13032 pClik5MCS	12,6
ATCC 13032 pClik5MCS PmetA metA	50,7
ATCC 13032 pClik5MCS Psod metA	100,7

Die Aktivität von MetA konnte durch die Verwendung der heterologen Expressionseinheit Psod erheblich gesteigert werden.

Patentansprüche**1. Verwendung einer Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend**

5 A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von
Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 %
auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder
10 C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO.
1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C)

15 zur Transkription von Genen.

15 **2. Verwendung einer Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Pro-
motoraktivität gemäß Anspruch 1 und zusätzlich funktionell verknüpft eine
Nukleinsäuresequenz, die die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleis-
tet, zur Expression von Genen.**

20 **3. Verwendung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die
Expressionseinheit enthält:**

25 E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von
Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 %
auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder
G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO.
2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
30 H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G).

35 **4. Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die
Expressionseinheit aus einer Nukleinsäure der Sequenz SEQ. ID. NO. 2
besteht.**

35 **5. Nukleinsäure mit Promotoraktivität, enthaltend**

A) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 1 oder
B) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von
Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 %

auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1 aufweist
oder

C) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO.
1 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder

5 D) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter A), B) oder C),
mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 1
ausgenommen ist.

10 6. Expressionseinheit, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß
Anspruch 5 und zusätzlich funktionell verknüpft eine Nukleinsäuresequenz, die
die Translation von Ribonukleinsäuren gewährleistet.

15 7. Expressionseinheit nach Anspruch 6, enthaltend
E) die Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 2 oder
F) eine von dieser Sequenz durch Substitution, Insertion oder Deletion von
Nukleotiden abgeleitete Sequenz, die eine Identität von mindestens 90 %
auf Nukleinsäureebene mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2 aufweist oder

20 G) eine Nukleinsäuresequenz, die mit der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO.
2 unter stringenten Bedingungen hybridisiert oder
H) funktionell äquivalente Fragmente der Sequenzen unter E), F) oder G),
mit der Maßgabe, dass die Nukleinsäure mit der Sequenz SEQ. ID. NO. 2
ausgenommen ist.

25 8. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Ge-
nen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch
a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von
endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die
Transkription von endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp
oder

30 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nuk-
leinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäu-
ren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer
Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf
die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

35 40

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

5 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

20 10. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Erhöhung oder Verursachung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp

25 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

30 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

35 11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit

40

Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

5 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

10 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

15 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

20 12. Verfahren nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Transkriptionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp

25 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription der endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

30 br) Nukleinsäuren mit reduzierter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription endogene Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

35 13. Verfahren zur Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate eines Gens in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp durch

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht oder

5 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

10 16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15 15 dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

20 20 dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

25 25 dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 30 17. Verfahren nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass man zur Reduzierung der Expressionsrate von Genen in Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp

35 35 cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von endogenen, Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der

endogenen Gene regulieren, im Vergleich zum Wildtyp reduziert oder

5 dr) Expressionseinheiten mit reduzierter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform cr) in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

10 18. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

15 25 19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Deydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrognease, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystahionin-gamma-Synthase, Cystahionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-

20 30 35 40

5 Synthasel, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

10

20. Expressionskassette, umfassend

- 15 a) mindestens eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und
- b) mindestens eine weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz, und
- c) gegebenenfalls weitere genetische Kontrollelemente,

wobei mindestens eine Expressionseinheit und eine weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz funktionell miteinander verknüpft sind und die weitere, zu exprimierende, Nukleinsäuresequenz in Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

20

25

30

35

21. Expressionskassette nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass die weitere, zu exprimierende Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist der Gruppe Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Enzymen

22. Expressionskassette nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Deydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrognease, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystahionin-gamma-Synthase, Cystahionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthasel, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serin-hydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase

23. Expressionsvektor enthaltend eine Expressionskassette gemäss einem der Ansprüche 20 bis 22.

24. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

a) Veränderung der spezifischen Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription mindestens eines endogenen Gens reguliert oder

5 b) Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

10 25. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15 20 b1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 b2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

30 b3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

35 26. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit erhöhter oder verursachter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass

40 ah) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von endogenen Genen regulieren, im Vergleich zum Wildtyp erhöht ist oder

5 bh) die Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform ah) reguliert wird, wobei die Gene in Bezug auf die Nukleinsäuren mit Promotoraktivität heterolog sind.

10 27. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Transkription von Genen im Mikroorganismus durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 oder durch Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1 mit veränderter spezifischer Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

15 bh1) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer endogener Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit Promotoraktivität, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

20 bh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Transkription eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Nukleinsäuren mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, erfolgt oder

25 bh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Promotoraktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu transkribierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

30 28. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 24 oder 25 mit reduzierter Transkriptionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

35 ar) die spezifische Promotoraktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Nukleinsäure mit Promotoraktivität gemäß Anspruch 1, die die Transkription von mindestens einem, endogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

5 br) eine oder mehrere Nukleinsäuren mit reduzierter Promotoraktivität gemäß Ausführungsform a) in das Genom des Mikroorganismus eingebracht wurden, so dass die Transkription mindestens eines endogenen Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Nukleinsäure mit reduzierter Promotoraktivität erfolgt.

10 29. Genetisch veränderter Mikroorganismus, wobei die genetische Veränderung zu einer Veränderung oder Verursachung der Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp führt und bedingt ist durch

15 c) Veränderung der spezifischen Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression mindestens eines endogenen Gens reguliert, im Vergleich zum Wildtyp oder

20 d) Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a), wobei die Gene im Bezug auf die Expressionseinheiten heterolog sind.

25 30. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

30 d1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

35 d2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

40

d3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressions-einheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit veränderter spezifi-scher Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

31. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit erhö-hter oder verursachter Expressionsrate mindestens eines Gens im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet, dass man

10 ch) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression der endogenen Gene reguliert, im Vergleich zum Wildtyp er-höht oder

15 dh) die Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinhei-ten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität gemäß Ausführungsform a) reguliert, wobei die Gene im Bezug auf die Expressi-onseinheiten heterolog sind.

20

32. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 31, dadurch gekenn-zeichnet, dass die Regulation der Expression von Genen im Mikroorganismus durch Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 oder durch Expressi-onseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit erhöhter spezifischer Expressions-aktivität gemäß Ausführungsform a) dadurch erreicht wird, dass man

25

dh1) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, ge-gabenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, in das Genom des Mikroorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder meh-rerer endogenen Gene unter der Kontrolle der eingebrachten Expressi-onseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, erfolgt oder

30

dh2) ein oder mehrere Gene in das Genom des Mikrorganismus einbringt, so dass die Expression eines oder mehrerer der eingebrachten Gene unter der Kontrolle der endogenen Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifischer Expressionsaktivität, er-folgt oder

35

dh3) ein oder mehrere Nukleinsäurekonstrukte, enthaltend eine Expressions-einheit gemäß Anspruch 2 oder 3, gegebenenfalls mit erhöhter spezifi-scher Expressionsaktivität, und funktionell verknüpft eine oder mehrere, zu exprimierende Nukleinsäuren, in den Mikroorganismus einbringt.

5

33. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 29 oder 30 mit redu-zierter Expressionsrate von mindestens einem Gen im Vergleich zum Wildtyp, dadurch gekennzeichnet dass,

10

cr) die spezifische Expressionsaktivität im Mikroorganismus von mindestens einer endogenen Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3, die die Expression von mindestens einem edogenen Gen reguliert, im Vergleich zum Wildtyp reduziert ist oder

15

dr) eine oder mehrere Expressionseinheiten gemäß Anspruch 2 oder 3 mit re-duzierter Expressionsaktivität in das Genom des Mikroorganismus einge-bracht wurden, so dass die Expression mindestens eines Gens unter der Kontrolle der eingebrachten Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 mit reduzierter Expressionsaktivität erfolgt.

20

34. Genetisch veränderter Mikroorganismus, enthaltend eine Expressionseinheit gemäß Anspruch 2 oder 3 und funktionell verknüpft ein zu exprimierendes Gen, wobei das Gen im Bezug auf die Expressionseinheit heterolog ist.

25

35. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 34, enthaltend eine Expressionskassette gemäß einem der Ansprüche 20 bis 22.

30

36. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach einem der Ansprüche 24 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nuk-leinsäuren kodierend ein Protein aus den Biosyntheseweg von proteinogenen und nicht-proteinogenen Aminosäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Nukleotiden und Nukleosiden, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von organischen Säuren, Nuk-leinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Lipiden und

35

Fettsäuren, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Diolen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Kohlenhydraten, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosynthe-seweg von aromatischen Verbindung, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Vitaminen, Nukleinsäuren kodierend ein Protein aus dem Biosyntheseweg von Cofaktoren und Nukleinsäuren kodierend ein Protein

40

aus dem Biosyntheseweg von Enzymen, wobei die Gene gegebenenfalls weitere Regulationselemente enthalten können.

37. Genetisch veränderter Mikroorganismus nach Anspruch 36, dadurch gekennzeichnet, dass die Proteine aus dem Biosyntheseweg von Aminosäuren ausgewählt sind aus der Gruppe Aspartatkinase, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Dehydrogenase, Diaminopimelat-Decarboxylase, Dihydrodipicolinate-Synthetase, Dihydrodipicolinate-Reduktase, Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, Pyruvat-Carboxylase, Triosephosphat-Isomerase, Transkriptioneller Regulator LuxR, Transkriptioneller Regulator LysR1, Transkriptioneller Regulator LysR2, Malat-Quinon-Oxidoreduktase, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Transketolase, Transaldolase, Homoserin-O-Acetyltransferase, Cystathionin-gamma-Synthase, Cystathionin-beta-Lyase, Serin-Hydroxymethyltransferase, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Phosphoserin-Aminotransferase, Phosphoserin-Phosphatase, Serin-Acetyl-Transferase, Homoserin-Dehydrogenase, Homoserin-Kinase, Threonin-Synthase, Threonin-Exporter-Carrier, Threonin-Dehydratase, Pyruvat-Oxidase, Lysin-Exporter, Biotin-Ligase, Cystein-Synthasel, Cystein-Synthase II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfatadenyltransferase Untereinheit 1 und 2, Phosphoadenosin Phosphosulfat Reduktase, Ferredoxin-sulfit-reductase, Ferredoxin NADP Reduktase, 3-Phosphoglycerat Dehydrogenase, RXA00655 Regulator, RXN2910-Regulator, Arginyl-t-RNA-Synthetase, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Threonin Efflux-Protein, Serinhydroxymethyltransferase, Fruktose-1,6-bisphosphatase, Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Protein OpcA, 1-Phosphofruktokinase und 6-Phosphofruktokinase.

38. Verfahren zur Herstellung von biosynthetischen Produkten durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24 bis 37.

39. Verfahren zur Herstellung von Lysin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Diaminopimelat-

Decarboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydrodipicolinate-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Dihydridipicolinate-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat-Isomerase, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LuxR, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR1, Nukleinsäuren kodierend einen Transkriptionellen Regulator LysR2, Nukleinsäuren kodierend eine Malat-Quinon-Oxodoreduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Deydrogease, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogease, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend einen Lysin Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, Nukleinsäuren kodierend eine Arginyl-t-RNA-Synthetase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein Protein OPCA, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase und Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphofructokinase,

20. 40. Verfahren nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat- Dehydrogenase-Aktivität, Diaminopimelat-Decarboxylase-Aktivität, Dihydrodipicolinate-Synthetase-Aktivität, Dihydridipicolinate-Reduktase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat-Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat-Isomerase-Aktivität, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LuxR, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR1, Aktivität des Transkriptionellen Regulators LysR2, Malat-Quinon-Oxodoreduktase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-Deydrogease-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogease-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Transaldolase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Arginyl-t-RNA-Synthetase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Fruktose-1,6-bisphosphatase-Aktivität, Protein OPCA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität und Biotin-Ligase-Aktivität aufweisen.

30. 41. Verfahren nach Anspruch 39 oder 40, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der

35. 40.

Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Homoserine-Kinase-Aktivität, Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität, Threonin-Exporter-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität und Threonin-Synthase-Aktivität aufweisen.

5

42. Verfahren zur Herstellung von Methionin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin O-Acetyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-gamma-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Cystathionin-beta-Lyase, Nukleinsäuren kodierend eine Serin-Hydroxymethyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase, Nukleinsäuren kodierend eine Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Aminotransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoserin-Phosphatase, Nukleinsäuren kodierend eine Serine Acetyl-TransferaseNukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase I, Nukleinsäuren kodierend eine Cystein-Synthase II , Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase, Nukleinsäuren kodierend eine Sulfat-Adenylyltransferase, Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Sulfit-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin NADPH-Reduktase, Nukleinsäuren kodierend eine Ferredoxin-Aktivität, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA077, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA248, Nukleinsäuren kodierend ein Protein der Sulfat-Reduktion RXA247, Nukleinsäuren kodierend einen RXA0655 Regulator und Nukleinsäuren kodierend einen RXN2910 Regulator.

10

15

20

25

30

35

40

43. Verfahren nach Anspruch 42, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Ho-

moserin Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Cystathionin-gamma-Synthase-Aktivität, Cystathionin-beta-Lyase-Aktivität Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulphydrylase-Aktivität, Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase-Aktivität, Phosphoserin-Aminotransferase-Aktivität, Phosphoserin-Phosphatase-Aktivität, Serin Acetyl-Transferase-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität I-Aktivität, Cystein-Synthase Aktivität II, Coenzym B12-abhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin-Synthase-Aktivität, Sulfat-Adenylyltransferase-Aktivität, Phosphoadenosin-Phosphosulfat-Reductase-Aktivität, Ferredoxin-Sulfit-Reduktase-Aktivität, Ferredoxin NADPH-Reduktase Aktivität, Ferredoxin-Aktivität, Aktivität Proteins der Sulfat-Reduktion RXA077, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA248, Aktivität eines Proteins der Sulfat-Reduktion RXA247, Aktivität eines RXA655-Regulators und Aktivität eines RXN2910-Regulators aufweisen.

44. Verfahren nach Anspruch 42 oder 43, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Homoserine-Kinase-Aktivität, Threonin-Dehydratase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität und Diaminopicolinat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

45. Verfahren zur Herstellung von Threonin durch Kultivierung von genetisch veränderten Mikroorganismen gemäß einem der Ansprüche 24, 25, 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, dass die Gene ausgewählt sind aus der Gruppe Nukleinsäuren kodierend eine Aspartatkinase, Nukleinsäuren kodierend eine Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine 3-Phosphoglycerat Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Pyruvat Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend eine Triosephosphat Isomerase, Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Kinase, Nukleinsäuren kodierend eine Threonin Synthase, Nukleinsäuren kodierend einen Threonin Exporter Carrier, Nukleinsäuren kodierend eine Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend eine Transaldolase, Nukleinsäuren kodierend eine Transketolase, Nukleinsäuren kodierend einer Malat-Quinon-Oxidoreductase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase, Nukleinsäuren kodierend

5 einen Lysin-Exporter, Nukleinsäuren kodierend eine Biotin-Ligase, , Nukleinsäuren kodierend eine Phosphoenolpyruvat-Carboxylase, Nukleinsäuren kodierend ein Threonin Efflux-Protein, Nukleinsäuren kodierend eine Fruktose-1,6-bisphosphatase, Nukleinsäuren kodierend ein OpcA Protein, Nukleinsäuren kodierend eine 1-Phosphofructokinase, Nukleinsäuren kodierend eine 6-
10 Phosphofructokinase, und Nukleinsäuren kodierend eine Homoserin-Dehydrogenase

15 46. Verfahren nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine erhöhte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Aspartatkinase-Aktivität, Aspartat-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivität, Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, 3-Phosphoglycerat Kinase-Aktivität, Pyruvat Carboxylase-Aktivität, Triosephosphat Isomerase-Aktivität, Threonin Synthase-Aktivität, Aktivität eines Threonin Export-Carriers, Transaldolase-Aktivität, Transketolase-Aktivität, Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase-Aktivität, Malat-Qinon-Oxidoreductase-Aktivität, Homoserin-Kinase-Aktivität, Biotin-Ligase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxylase-Aktivität, Threonin-Efflux-Protein-Aktivität, Protein OpcA-Aktivität, 1-Phosphofructokinase-Aktivität, 6-Phosphofructokinase-Aktivität, Fruktose 1,6 bisphosphatase-Aktivität, 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase und Homoserin-Dehydrogenase-Aktivität aufweisen.

20 47. Verfahren nach Anspruch 45 oder 46, dadurch gekennzeichnet, dass die genetisch veränderten Mikroorganismen im Vergleich zum Wildtyp zusätzlich eine reduzierte Aktivität, mindestens einer der Aktivitäten, ausgewählt aus der Gruppe Threonin Dehydratase-Aktivität, Homoserin O-Acetyltransferase-Aktivität, Serin-Hydroxymethyltransferase-Aktivität, O-Acetylhomoserin-Sulfhydrylase-Aktivität, Meso-Diaminopimelat D-Dehydrogenase-Aktivität, Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Aktivität, Pyruvat-Oxidase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Synthetase-Aktivität, Dihydrodipicolinat Reduktase-Aktivität, Asparaginase-Aktivität, Aspartat-Decarboxylase-Aktivität, Lysin-Exporter-Aktivität, Acetolactat-Synthase-Aktivität, Ketol-Aid-Reductoisomerase-Aktivität, Branched chain aminotransferase-Aktivität, Coenzym B12-abhängige Methionin Synthase-Aktivität, Coenzym B12-unabhängige Methionin Synthase-Aktivität, Dihydroxy-acid Dehydratase-Aktivität und Diaminopimelat Decarboxylase-Aktivität aufweisen.

25 48. Verfahren nach einem der Ansprüche 38 bis 47, dadurch gekennzeichnet, dass die biosynthetischen Produkte nach und/oder während des Kultivierungs-

30

35

40

schriften aus dem Kultivierungsmedium isoliert und gegebenenfalls aufgerei-
nigt werden.

49. Verwendung der Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44 als ribosomale Bin-
5 dungsstelle in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakteri-
en der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
50. Verwendung der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als
10 -10-Region in Expressionseinheiten, die die Expression von Genen in Bakteri-
en der Gattung *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglichen.
51. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung
15 *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend die Nukleinsäu-
resequenz SEQ. ID. NO. 44.
52. Expressionseinheit gemäß Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, dass die
Nukleinsäuresequenz SEQ. ID. NO. 44. als ribosomale Bindungsstelle ver-
wendet wird.
53. Expressionseinheit, die die Expression von Genen in Bakterien der Gattung
20 *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* ermöglicht, enthaltend mindestens eine
der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43.
54. Expressionseinheit gemäß Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass eine
25 der Nukleinsäuresequenzen SEQ. ID. NOs. 42 oder 43 als -10-Region ver-
wendet wird.

SEQUENCE LISTING

<110> BASF Aktiengesellschaft

<120> Psod-Expressionseinheiten

<130> PF 55185/Mec

<140> 20030320

<141>

<160> 44

<210> 1

<211> 173

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SUPEROXID\DISMUTASE\RXA03119\

<400> 1

gctgccattt attccggcgt tgtgacccgc taccggataaa ataggtcggt tgaaaaattt 60

cgttgcaata tcaacaaaaa ggcctatcat tgggagggtgt cgcaccaagt acttttgcga 120

agcgccatct gacggatttt caaaaagatgt atatgctcg tgcgaaaacc tac 173

<210> 2

<211> 191

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SUPEROXID\DISMUTASE\RXA03119\

<400> 2

agctgccattt tattccgggc ttgtgacccg ctacccgata aataggtcggt ctggaaaaattt 60

tcttttgcgt atcaacaaaaa aggccatatca ttgggagggtgt tcgcaccaag tacttttgcg 120

aacgcgcattc tgacggatttt tcaaaaagatgt tatatgctcg gtgcggaaac ctacgaaagg 180

attttttacc c 191

<210> 3

<211> 1365

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> RXA00077

<400> 3

atgaatgatg agaatattca aagctccaac tatcagccat tcccgagttt tgacgattgg 60

aaacagatcg aggtgtcgct ctttagatgtc atcgaatcct cacgcccattt ttctgatttg 120

aaagatagca ctgatcggttc tgcgttagat gctgcgttag agagagcaaa aagagctgcc 180

gcagttgata ccaatgccat agaaggaatc ttccaaactg atcgcgggttt taccataca 240

gttgcaacgc aggttaggggc ttgggagcaa caaatggcga tgaaaggcaa acatgttaag 300

cctgcgtttg acgatactct agaaggcttt gagtatgttc tcgatgcagt aactggtaga 360
actccaatct ctcagcaatg gattagaaat ttgcacgccc tcattctgcg gagccaagaa 420
agccacgagg ttttacagc cggtggagtc caaaatcagg cgcttcagaa aggcgagtt 480
aaaactcagc caaatagtc acagcgctca gatggatctg tacatgcata cgccccagtt 540
gaagatactc ctgctgaaat ggctagattt atttcagaac ttgaatctaa ggaattctta 600
gcagccgaga aggttattca agctgcctat gcccactatg ctttcgtatg tattcatcct 660
tttgcagatg ggaatggacg agttgcacga gccttggcta gtgttttct atacaaagat 720
cctggtgtcc ctctcgtaat ctaccaagat caacgcagag attacatcca tgctctagaa 780
gcagcggaca agaataaccc gctcctgctg attagattct ttgctgaacg agtgaccgat 840
actattaact ctattatcg tgcactact accccgatcg cgggtaaatc tggttcggct 900
aagcttcgg atgcgctacg ccccactcgc gtattaccag aattacatga tgctgcacat 960
aggctccaag aaagtttatt tacagaaatc cgatctcgat tggatgaaga aggaaaaagg 1020
aatgggttgg agtttctact tcaacggatt tttatcggtt ccccattcaa tctgccagag 1080
ggctataacg cttccctga tagctattgt ctgacccttag cttcaatag caactctcca 1140
aaacaaatct tccacccgct atccatagta atagcagctc gagatggaa aagagcggac 1200
agcgacctcg tggcagctac ttctattgga tacaacttgc acgcttacgg acgtgaagtc 1260
gaggctgttg ttactgaaag ctttcgagaa cgtgtaaaaa tttacgcccga cgggattgtt 1320
gatcacttct taaccgaact ggctaaaaag tttcaacaga attaa 1365

<210> 4
<211> 454
<212> PRT
<213> *Corynebacterium glutamicum*

```

<400> 4
Met Asn Asp Glu Asn Ile Gln Ser Ser Asn Tyr Gln Pro Phe Pro Ser
    1           5           10          15

Phe Asp Asp Trp Lys Gln Ile Glu Val Ser Leu Leu Asp Val Ile Glu
    20          25          30

Ser Ser Arg His Phe Ser Asp Leu Lys Asp Ser Thr Asp Arg Ser Ala
    35          40          45

Leu Asp Ala Ala Leu Glu Arg Ala Lys Arg Ala Ala Ala Val Asp Thr
    50          55          60

Asn Ala Ile Glu Gly Ile Phe Gln Thr Asp Arg Gly Phe Thr His Thr
    65          70          75          80

Val Ala Thr Gln Val Gly Ala Trp Glu Gln Gln Met Ala Met Lys Gly
    85          90          95

Lys His Val Lys Pro Ala Phe Asp Asp Thr Leu Glu Gly Phe Glu Tyr
   100         105         110

```

Val Leu Asp Ala Val Thr Gly Arg Thr Pro Ile Ser Gln Gln Trp Ile
115 120 125

Arg Asn Leu His Ala Val Ile Leu Arg Ser Gln Glu Ser His Glu Val
130 135 140

Phe Thr Ala Val Gly Val Gln Asn Gln Ala Leu Gln Lys Gly Glu Tyr
145 150 155 160

Lys Thr Gln Pro Asn Ser Pro Gln Arg Ser Asp Gly Ser Val His Ala
165 170 175

Tyr Ala Pro Val Glu Asp Thr Pro Ala Glu Met Ala Arg Phe Ile Ser
180 185 190

Glu Leu Glu Ser Lys Glu Phe Leu Ala Ala Glu Lys Val Ile Gln Ala
195 200 205

Ala Tyr Ala His Tyr Ala Phe Val Cys Ile His Pro Phe Ala Asp Gly
210 215 220

Asn Gly Arg Val Ala Arg Ala Leu Ala Ser Val Phe Leu Tyr Lys Asp
225 230 235 240

Pro Gly Val Pro Leu Val Ile Tyr Gln Asp Gln Arg Arg Asp Tyr Ile
245 250 255

His Ala Leu Glu Ala Ala Asp Lys Asn Asn Pro Leu Leu Leu Ile Arg
260 265 270

Phe Phe Ala Glu Arg Val Thr Asp Thr Ile Asn Ser Ile Ile Val Asp
275 280 285

Leu Thr Thr Pro Ile Ala Gly Lys Ser Gly Ser Ala Lys Leu Ser Asp
290 295 300

Ala Leu Arg Pro Thr Arg Val Leu Pro Glu Leu His Asp Ala Ala His
305 310 315 320

Arg Leu Gln Glu Ser Leu Phe Thr Glu Ile Arg Ser Arg Leu Asp Glu
325 330 335

Glu Gly Lys Arg Asn Gly Leu Glu Phe Leu Leu Gln Arg Ile Phe Ile
340 345 350

Gly Ser Pro Phe Asn Leu Pro Glu Gly Tyr Asn Ala Phe Pro Asp Ser
355 360 365

Tyr Cys Leu Thr Leu Ala Phe Asn Ser Asn Ser Pro Lys Gln Ile Phe
370 375 380

His Pro Leu Ser Ile Val Ile Ala Ala Arg Asp Gly Lys Arg Ala Ser
385 390 395 400

Ser Asp Leu Val Ala Ala Thr Ser Ile Gly Tyr Asn Phe His Ala Tyr
405 410 415

Gly Arg Glu Val Glu Pro Val Val Thr Glu Ser Phe Arg Glu Arg Val
420 425 430

Lys Ile Tyr Ala Asp Gly Ile Val Asp His Phe Leu Thr Glu Leu Ala
435 440 445

Lys Lys Phe Gln Gln Asn
450

<210> 5
<211> 35
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID5

<400> 5
gagagagaga cgcgtccca g tggctgagac gcata

35

<210> 6
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_6

<400> 6
ctctctctgt cgacgaattc aatcttacgg cctg

34

<210> 7
<211> 4323
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_7

<220>
<221> misc_feature
<222> (457)..(1248)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (1515)..(2375)
<223> Ori-EC (pMB)

<220>
<221> misc_feature
<222> (1515)..(2375)
<223> Ori-EC (pMB) complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (2418)..(3839)
<223> SacB complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3840)..(4302)
<223> PsacB complement

<400> 7
tcgagaggcc tgacgtcgaa cccggtagcca cgcgtcatat gactagttcg gacctaggga 60

tatcgtcgac atcgatgctc ttctgcgtta attaacaatt gggatcctct agacccggga 120
ttaaaatcgc tagcgggctg ctaaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180
cggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggaa aaacgcaagc 240
gcaaagagaa agcaggttagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggcgggtt 300
tatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360
ccctgcaaag taaaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420
agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcatga ttgaacaaga tggattgcac 480
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcgct atgactggc acaacagaca 540
atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc aggggcgc ccc ggttctttt 600
gtcaagaccc acctgtccgg tgccctgaat gaaactgcagg acgaggycagc gcggctatcg 660
tggctggcca cgacgggcgt tccttgcgca gctgtgctcg acgttgcac tgaagcggga 720
aggactggc tgctattttggg cgaagtgcgg gggcaggatc tcctgtcatc tcaccttgct 780
cctccgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgcaccc 840
gctacctgcc cattcgacca ccaagcggaa catcgcatcg agcgagcactg tactcgatg 900
gaagccggc ttgtcgatca ggtatctcg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960
gaactgttcg ccaggctcaa ggcgcgcatg cccgacggcg aggatctcg cgtgacccat 1020
ggcgatgcct gcttgcgaa tatcatggtg gaaaatggcc gctttctgg attcatcgac 1080
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatacg cgttggctac ccgtgatatt 1140
gctgaagagc ttggccggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg tatcgccgct 1200
cccgattcgc agcgcatcgc cttctatcgc cttcttgacg agttttctcg agcgggactc 1260
tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320
ccgcccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgcccc ccggacgcgc ggctggatga 1380
tcctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcccc cgctagcggc ggcgcggccg 1440
gcccggtgtg aaataccgca cagatgcgtc aggagaaaaat accgcatacg ggcgccttcc 1500
gcttcctcgc tcactgactc gctgcgcctcg gtcgttcggc tgcggcgcgc ggtatcagct 1560
cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620
tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgttttc 1680
cataggctcc gccccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740
aacccgacag gactataaaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgcct 1800
cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc gggaaagcgtg 1860
gcgccttc atagctcactc ctgttaggtat ctcagttcgg ttaggtcgat tcgctccaag 1920
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccggttcag cccgaccgct gcgccttatac cgtaactat 1980

cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040
aggatttagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100
tacggctaca ctagaaggac agtatttggt atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc 2160
ggaaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cggtggttt 2220
tttggggca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280
tttctacgg ggtctgacgc tcagtggAAC gaaaactcac gttaaggat tttggtcatg 2340
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgcacatcg 2400
catttcttt tgcgtttta tttgttaact gttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460
ttgacaacag atgttttctt gcctttagatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgc 2520
tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatacgctt taatcacgac attgtttcct 2580
ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaaggta catcgtagg atcaagatcc 2640
attttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgtatg ggccagttaa agaatttagaa 2700
acataaccaa gcatgttaat atcgttagac gtaatgccgt caatcgatc tttgtatcc 2760
cgggagtcag tgaacaggtt ccatttgcgg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt 2820
tcatctgtta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca ctttttcag tttgttaatca 2880
tcgttttagct caatcataacc gagagcgcgg tttgttaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940
ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgtatg tgctttgcc atagttatgc 3000
ttgttaataa aagattcttc gccttggtag ccatcttcag ttccagtgtt tgcttcaaat 3060
actaagtatt tttttttttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atgggtgtcg 3120
cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgtatcgt ttttccgtca 3180
ccgtcaaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgcgtt tcaaaagatgt gtctgtatgc 3240
gatacgtaa cttgtgcagt tgtcagtgtt tgtttgcgtt aatgtttacc ggagaaatca 3300
gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaatgtgg ctgaacctga ccattctgt 3360
tttgggtctt ttaggataga atcatttgca tgcattttgt cgctgtttt aaagacgcgg 3420
ccagcgtttt tccagctgtc aatagaagtt tcgcccactt tttgtatagaa catgtaaatc 3480
gatgtgtcat ccgcattttt aggatctccg gctaattgcaaa agacgtgtg gtgtccgtga 3540
tagtttgcga cagtgcgtc agcggtttgtt aatggccagc tgcgttttttgcgtt 3600
tttgcagaag agatattttt aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atattttca 3660
ttttttgtt gttcaggat ttgcagcata tcatggcgtt taatatggaa aatgccgtat 3720
gtttccttat atggcttttgcgtt gttcgtttctt ttcgcaaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780
agcagtgcgg tagtaaaggtaataactgtt gtttgcgtt ctttttttgcgtt 3840
gttcatgtct cttttttat gtactgttttgcgtt agcggtctgc ttcttccagc cttccgtttt 3900

gaagatggca agtttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc 3960
caaagtatac actttgcctt ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaaac 4020
ccgcgcgatt tactttcga cctcattcta ttagactctc gtttggattt caactggtct 4080
attttcctct tttgttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaaga 4140
actaaaaaat ctatctgttt cttttcatttc tctgttattt ttatagtttc tgttgcatgg 4200
gcataaaagtt gccttttaa tcacaattca gaaaatataca taatatctca tttcactaaa 4260
taatagtcaa cgccaggat atgtgatggg taaaaaggaa tcggcggccg ctcgatttaa 4320
atc 4323

<210> 8
<211> 5860
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PCIS\LYSC

<220>
<221> misc_feature
<222> (155)..(1420)
<223> lysC

<220>
<221> misc_feature
<222> (1974)..(2765)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3032)..(3892)
<223> Ori-EC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3913)..(3934)
<223> sacB downstream complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3935)..(5356)
<223> sacB (Bacillus Subtilis) complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (5357)..(5819)
<223> Promotor sacB complement

<400> 8
cccggtacca cgcgtccca gggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggttagag ttgagcgggt 120
aactgtcagc acgttagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggcgtac agaaatatgg 180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcataaaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240

caagaaggct ggaaatgatg tcgtggtgt ctgctccga atggagaca ccacggatga 300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cggtccgcca gctcgtaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgta tttctaaccgc tctcgccatggctattg agtcccttgg 420
cgcagaagcc caatcttca cgggctctca ggctggtgtg ctcaccacccg agcgcacgg 480
aaacgcacgc attgttgatg tcactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctgggt tccagggtgt taataaaagaa acccgcatg tcaccacgtt 600
gggtcggtt ggttctgaca ccactgcagt tgctgtggca gctgcttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcgacg ttgacgggtgt gtataaccgtt gacccgcgca tcgttccctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggctc 780
caagattttg gtgctgcgca gtgtgaata cgctcggtca ttcaatgtgc cacttcgcgt 840
acgctcgct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
tgttgaagaa gcagtcctta cgggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
tctgggtatt tccgataagc caggcgaggc tgctgaagggtt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctttct gttagaagacg gcaccaccga 1080
catcaccccttc acctgcctc gttccgacgg ccggccgcgcg atggagatct tgaagaagct 1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgc caggtcggca aagtctccct 1200
cgtgggtgct ggcataactg ctcacccagg tggttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgatattt ccgtgctgat 1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcttgcat gagcagttcc agctggcg 1380
cgaagacgaa gccgtcggtt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gagtagttt 1440
acaatgacca ccatcgcaactg tgggttgca accggccagg tcggccaggt tatgcgcacc 1500
cttttggaaag agcgcaattt cccagctgac actgttcgtt tcttgccttc cccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcttaatt aacaattggg 1620
atccctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggtcgtaa aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagtcgc cagaaacgg tgctgaccccc ggttgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
caaggaaaaa cgcaagcgca aagagaaaagc aggttagctt cagtggttcc acatggcgat 1800
agctagactg ggcgggttta tggacagcaa gcaaccgga attgcccagct gggcgccct 1860
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaaggatct 1920
gatggcgca gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgatcc cgcatttttgc 1980
aacaagatgg attgcacgca gtttctccgg cggcttgggt ggagaggcta ttccggctatg 2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgcccggctg gttccggctg tcagcgca 2100
ggcccccggcgt tcttttgc aagaccgacc tggccgggtc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160

aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgcgcagct gtgctcgacg 2220
ttgtcaactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcga agtgcgggg caggatctcc 2280
tgtcatctca ccttgctcct gccgagaaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2340
tgcatcagct tgatccggct acctgcccatt tcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 2400
gagcacgtac tcggatggaa gccggcttgc tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gcgcattgccc gacggcgagg 2520
atctcgctgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggatggaa aatggccgct 2580
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
tggctacccg tgatattgtc gaagagcttgc gcggcgaatg ggctgaccgc ttctcgctgc 2700
tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcattgcctt ctatgcctt ctgcacgagt 2760
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccc acctgccatc 2820
acgagatttc gattccacccg ccgccttcta taaaaggttt ggcttcggaa tcgtttccg 2880
ggacgcccggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtaaaa taccgcacag atgcgttaagg agaaaatacc 3000
gcattcaggcg ctcttcggct tcctcgctca ctgactcgct gcgcctggc gttcggctgc 3060
ggcagcgggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa tcaggggata 3120
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggcc agcaaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180
cggtgctggc gttttccat aggctccggc cccctgacga gcattcacaaa aatcgacgct 3240
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgaaa cccctggaa 3300
gctccctcggt ggcgcctcct gttccgaccc tgccgcttac cggataacctg tccgcctt 3360
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gtcacgctg taggtatctc agttcggtgt 3420
aggcgttgc ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
ccttatccgg taactatcgat cttgagtcac acccggtaa acacgactta tcgcccactgg 3540
cagcagccac tggtaaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct acagagttct 3600
tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatac tgctcgctgc 3660
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttt gtagctcttgc atccggcaaa caaaccaccc 3720
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcacgc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggct ctgacgctca gtggAACGAA aactcacgtt 3840
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttac ctagatcctt taaaaggccg 3900
gccgcggccg ccatcggcat tttctttgc gtttttattt gttaactgtt aattgtcctt 3960
gttcaaggat gctgtctttt acaacagatg ttttcttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cggtgattgt ttgtctcgct agaattcctt gtttgcata tagcttgtaa 4080

tcacgacatt gtttccttc gcttgaggta cagcgaagt tgagtaagta aaggttacat 4140
cgtaggatc aagatccatt tttAACACAA ggCCAGTTT gttcAGCGGC ttgtatggc 4200
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaatatc gttagacgta atGCCGTCAA 4260
tcgtcatttt tgatCCGCGG gagTCAGTGA acaggtacca tttGCCGTTc attttaaaga 4320
cgTTCGCGCG ttcaatttca tctgttactg tgTTAGATGC aatcAGCGGT ttcATCACTT 4380
tttCAGTGT gtaatcatcg tttAGCTAA tcataACCAG agCAGCCGTT gctaACTCAG 4440
ccgtgcgttt ttatcgcTT tgcAGAAGTT tttGACTTC ttGACGGAAG aatGATGTGC 4500
tttGCCATA gtatGCTTG ttaaATAAAG attCTTCGCC ttGGTAGCCA tcttcAGTTc 4560
cagtGTTGC ttcaaataact aagtatttgc ggcTTTATC ttctACGTAG tgAGGATCTC 4620
tcAGCGTATG gttGTCGCTT gagCTGTAgt tgcCTTCATC gatGAACtGC tgcACATTt 4680
gatacgtttt tccgtcaccc tcAAAGATTG atttATAATC ctctACACCG ttGATGTTCA 4740
aagAGCTGTC tgatGCTGAT acgttaACTT gtGAGTTGt cAGTGTtGt ttGCCGTAAT 4800
gttaccgga gaaatcagtG tagaATAAAC ggATTTTCC gtcAGATGTA aatGTTGGCTG 4860
aacctgacca ttcttGTTTt ggTCTTTA ggatAGAATC atttGATCG aatttGTCGc 4920
tgtCTTAAA gacGCGGCCA gcgtTTTCC agctGTCAAT agaAGTTG CCGACTTTT 4980
gatAGAAATCAt gttGTCATCCG cATTttAGG atCTCCGGt aAtGCAAAGA 5040
cgatGTTGTA gcccgtatAG tttGCGACAG tgcCGTCAGC gtttGTAAT gGCCAGCTG 5100
cccaAAACGTC caggCCTTT GcAGAAGAGA tATTTTAAT tggGACGAA tcAAATTCAg 5160
aaACTTGATA ttttCATTt tttGCTGTT caggGATTG cAGCATATCA tggCGTGTAA 5220
tatGGGAAAT gcccgtatGTT tcCTTATATG gttttGGTT cgTTTCTTC gcaaACGCTT 5280
gagttGCGCC tcctGCCAGC agtGCGGTAG taaAGGTTAA tactGTTGCT tgTTTGCAA 5340
actTTTGTat gttcAtCGTT catGTCCT ttttATGTA ctGTTGCTAGC ggtCTGCTTC 5400
ttccAGCCCT cctGTTGAA gatGGCAAGT tagTTACGCA caATAAAAAA agACCTAAAA 5460
tatGTAAGGG gtGACGCCAA agtATAACt ttGCCCTTA cacATTTAG gtCTTGCTG 5520
ctttATCAGT aacAAACCCG cgcGATTAC tttcGACCT cATTCTTAA gACTCTCGTT 5580
tggATTGCAA ctggTCTATT ttCCCTTTT gtttGATAGA aaATCATAAA aggATTTGCA 5640
gactACGGGC ctaAAAGAACT aaaaaATCTA tctGTTCTT ttcATTCTCT gtATTTTTA 5700
tagTTTCTGT tgcatGGGCA taaAGTTGCC ttttAAATCA caATTCAAGAA aATATCATAA 5760
tatCTCATT cactAAATAA tagTGAACGG cAGGTATATG tgATGGGTAA aaaAGGATCG 5820
gcggCCGCTC gattAAATC tcGAGAGGCC tgacGTCGGG 5860

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcggt ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt 1080
accgcagagt tcatggaaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaaatt gattccacc 1140
tctgagattc gtatccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200
ttgcatgagc agttccagct gggccgcgaa gacgaagccg tcgttatgc aggcaccgg 1260
cgc 1263

<210> 12
<211> 5860
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PCIS\LYSC\THR311ILE

<220>
<221> misc_feature
<222> (155)..(1420)
<223> LysC

<220>
<221> misc_feature
<222> (1974)..(2765)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (3032)..(3892)
<223> Ori-EC (pMB)

<220>
<221> misc_feature
<222> (3913)..(3934)
<223> C_region : sacB downstream (complement)

<220>
<221> misc_feature
<222> (3935)..(5356)
<223> sacB Bacillus Subtilis (complement)

<220>
<221> misc_feature
<222> (5357)..(5819)
<223> Promotor sacB (complement)

<400> 12
ccccgtacca cggtcccaag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
agaaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagttat aaaggttagag ttgagcgggt 120
aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg 180
cggttccctcg cttagagatcg cgaaacgcata tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240
caagaaggct ggaaatgtatcg tcgtgggtgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
acttctagaa ctgcagcgg cagtgaatcc cggtccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgtta ttcttaacgc tctcgccat atggctattg agtcccttg 420

cgcagaagcc caatcttca cgggctctca ggctggtggtg ctcaccacccg agcgccacgg 480
aaacgcacgc attgttgatg tcactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctgggtt tccagggtgt taataaagaa acccgcgatg tcaccacgtt 600
gggtcgtgggt ggttctgaca ccactgcagt tgccgtggca gctgcttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcggacg ttgacgggtgt gtataccgct gaccgcgc tgcgttctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcaagttcga agaaatgctg gaacttgctg ctgttggctc 780
caagattttg gtgctgcgc tgcgttgcata cgctcgtgc ttcaatgtgc cacttcgcgt 840
acgctcgct tatagttaatg atccccgcac ttgttgcgc ggctctatgg aggatattcc 900
tgtggaaagaa gcagtcctta ccgggtgcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
tctgggtatt tccgataaggc caggcgaggc tgcaaggtt ttccgtgcgt tggctgatgc 1020
agaaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctttct gttagaagacg gcaccaccga 1080
catcatcttc acctgcctc gttccgacgg ccggccgcgc atggagatct tgaagaagct 1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgc ttacgacgc caggtcggca aagtctccct 1200
cgtgggtgct ggcataatgc ctcacccagg tggttaccgca gagttcatgg aagctctgcg 1260
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgttattt ccgtgcgtat 1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgcgtgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctggcg 1380
cgaagacgaa gccgtcggtt atgcaggcac cggacgctaa agtttaaag gagtagttt 1440
acaatgacca ccatcgcaatg tggttgcgc accggccagg tcggccaggt tatgcgcacc 1500
cttttggaaag agcgcaattt cccagctgac actgttcgtt tctttgcctt cccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgtcttc tgcttgcattt aacaattggg 1620
atccctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagttcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
caaggaaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagctt cagtggttcc acatggcgat 1800
agctagactg ggcgggtttt tggacagcaa gcgaaccggaa attgcccgcgtt gggggccct 1860
ctggtaaggt tggaaagccc tgcaaaagtaa actggatggc tttcttgcgc ccaaggatct 1920
gatggcgcaatc gggatcaaga tctgtatcaag agacaggatg aggatcgatcc cgcattgtt 1980
aacaagatgg attgcacgcgca ggttctccgg ccgttgggtt ggagaggcta ttccgttatg 2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgcccggatgtt ccgttgcgtt ccgttgcagg 2100
ggcgcccggt tcttttgc tggacggacc tggccgtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
aggcagcgccg gctatcgatgg ctggccacga cggccgttcc ttgcgcgcgtt gtgcgtgcacg 2220
ttgtcactga agcggaaagg gactggctgc tattggcgaa agtgcgggg caggatctcc 2280
tgtcatctca ctttgccttccat ggcgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcg 2340

tgcatcgtctgatccggct acctgcccattcgaccacca agcgaaacat cgcatcgagc 2400
gaggcacgtac tcggatggaa gccggcttgc tcgatcagga tgatctggac gaagagcata 2460
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc ggcgcattgccc gacggcgagg 2520
atctcgctgt gacccatggc gatgcctgct tgccgaatat catggatggaa aatggccgct 2580
tttctggatt catcgactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
tggctaccccg tgatattgtc gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttccctcggtc 2700
tttacggtat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgccctt ctatcgccctt cttgacgagt 2760
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgcacccca acctgcccata 2820
acgagatttc gattccacccg ccgccttcta tgaaaggttg ggcttcggaa tcgtttccg 2880
ggacgccccgc tggatgatcc tccagcgcgg gnatctcatg ctggagttct tcgcacccacgc 2940
tagcggcgcg ccggccggcc cggtgtgaaa taccgcacag atgcgttaagg agaaaataacc 3000
gcatcaggcgc ctcttccgt tcctcgctca ctgactcgct gcgcctcggtc gttcggctgc 3060
ggcgagcggat atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggtt atccacagaa tcagggata 3120
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt aaaaaggccg 3180
cgttgctggc gttttccat aggctccgccc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240
caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaaagata ccaggcggtt cccctggaa 3300
gctccctcggt ggcgcctcgat gttccgaccc tgccgcttac cggataacctg tccgcctt 3360
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gtcacgcgtg taggtatctc agttcggtgt 3420
aggcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaacccccc cggtcagccca gaccgctgcg 3480
ccttatccgg taactatcgt cttagtcca acccggtaaag acacgactta tcgcccactgg 3540
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggccgtgct acagagttct 3600
tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatac tgcgcctcg 3660
tgaagccagt tacccatcgga aaaagagttg gtagctctg atccggcaaa caaaccaccc 3720
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcagaac gcaagattac ggcgcagaaaa aaaggatctc 3780
aagaagatcc tttgatcttt tctacgggt ctgacgctca gtggaaacgaa aactcacgtt 3840
aagggattt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
gccgcggccg ccatcggcat tttctttgc gtttttattt gttaactgtt aattgtcctt 3960
gttcaaggat gctgtcttgc acaacagatg tttcttgc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cggtgattgt ttgtctcggt agaatcctt gtttgcata tagcttgc 4080
tcacgacatt gtttccttgc gtttgcgtt cagcgttgc ttagtgcata aaggttacat 4140
cgtaggatc aagatccatt tttaacacaa ggccagttt gttcagcggc ttgtatggc 4200
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tggtaatatac gtttagacgtt atgcgtcaa 4260

tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga 4320
cgctcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tggtagatgc aatcagcggt ttcatcatctt 4380
tttcagtgt gtaatcatcg tttagctcaa tcataaccgag agcgccgttt gctaactcag 4440
ccgtgcgttt ttatcgctt tgccagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgcttg taaaataaaag attcttcgccc ttggtagccat ctttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaaataact aagtatttgt ggccctttatc ttctacgttag tgaggatctc 4620
tcagcgtatg gttgtcgccct gagctgttagt tgcccttcatc gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcaccc tc当地agattt atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttggccgtaat 4800
gtttaaccgga gaaatcagtg tagaataaaac ggattttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgcgtt tggctttta ggatagaatc atttgcacccg aatttgcgc 4920
tgtcttaaaa gacgcggcca gcgttttcc agctgtcaat agaagttcg ccgactttt 4980
gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcccttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacctgata ttttcattt ttttgcgtt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatgtt tccttatatg gctttgggtt cgtttcttcc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tcctgcccagc agtgcggtag taaaggtta tactgttgct tgtttgca 5340
acttttgat gttcatcggtt catgtctcct ttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgttaaggg gtgacgccaa agtatacact ttgcccttta cacattttag gtcttgccctg 5520
ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgaccc tattcttata gactctcggtt 5580
tggattgcaa ctggtctatt ttcctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcattctct gtattttta 5700
tagtttctgt tgcatggca taaagttgcc ttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaatac tcgagaggcc tgacgtcg 5860

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SOD8

<400> 13

accctggcgaaaccctgag tcg
<210> 14
<211> 65
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SOD1

<400> 14
tagcaccagg gccacggta aaaaatcctt tcgttaggttt ccgcaccgag catatacatac 60
ttttg 65

<210> 15
<211> 40
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> LYSC2

<400> 15
cctacgaaag gatttttac ccgtggccct ggtcgtacag 40

<210> 16
<211> 21
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> LYSC6

<400> 16
gattagtggaa acctcgctgt c 21

<210> 17
<211> 19
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SOD4

<400> 17
gcggcgcaagg attttctaa 19

<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> LYSC4

<400> 18
tcggttgcct gagtaatgtc tt 22

<210> 19
<211> 5720
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
<223> PK19

<220>
<221> misc_feature
<222> (2706)..(3968)
<223> lysC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3969)..(4166)
<223> Psod complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (4538)..(5236)
<223> 5' lysC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (5626)..(6420)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (6449)..(6911)
<223> PsacB

<220>
<221> misc_feature
<222> (6912)..(6)
<223> sacB

<400> 19
ggtcgactct agaggatccc cgggttaccga gctcgaattc actggccgtc gttttacaac 60
gtcgtgactg ggaaaacctt ggcgttaccc aacttaatcg cttgcagca catccccctt 120
tcgccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg cccttccaa cagttgcgca 180
gcctgaatgg cgaatggcga taagcttagct tcacgctgcc gcaagcactc agggcgcaag 240
ggctgctaaa ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacggtg ctgaccccg 300
atgaatgtca gctactgggc tatctggaca agggaaaacg caagcgc当地 gagaaagcag 360
gttagcttgca gtgggcttac atggcgatag cttagactggg cggtttatg gacagcaagc 420
gaaccggaat tgccagctgg ggcgcctct ggttaaggttt ggaagccctg caaagtaaac 480
tggatggctt tcttgcgc当地 aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc tgatcaagag 540
acaggatgag gatcggttcg catgattgaa caagatggat tgcacgc当地 ttctccggcc 600
gcttgggtgg agaggctatt cggctatgac tgggcacaac agacaatcg ctgctctgat 660
gccgc当地gtgt tccggctgtc agcgc当地ggg cggccgggttc ttttgtcaa gaccgacactg 720

tccggtgccc tgaatgaact ccaagacgag gcagcgcggc taticgtggct ggccacgacg 780
ggcggttcctt ggcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta 840
ttggggcgaag tgccgggca ggatctcctg tcatctcacc ttgctcctgc cgagaaagta 900
tccatcatgg ctgtatgcataat gccccggctg catacgctt atccggctac ctgccccattc 960
gaccaccaag cggaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cgggtttgtc 1020
gatcaggatg atctggacga agagcatcag gggctcgcc cagccgaact gttcgccagg 1080
ctcaaggcgc gcatggccca cggcgaggat ctcgtcgtga cccatggcga tgcctgcttgc 1140
ccgaatatca tgggtggaaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg cccgctgggt 1200
gtggcggacc gctatcagga catagcgtt gctacccgtg atattgctga agagcttggc 1260
ggcgaatggg ctgaccgcctt cctcgtgtt tacggtatcg ccgcctccga ttgcagcgc 1320
atcgcccttct atcgcccttct tgacgagttc ttctgagcgg gactctgggg ttgccttagag 1380
gatcgatcct ttttaaccca tcacatatac ctgcccgttca ctattattta gtgaaatgag 1440
atattatgat attttctgaa ttgtgattaa aaaggcaact ttatgccat gcaacagaaaa 1500
ctataaaaaaa tacagagaat gaaaagaaac agatagattt ttttagttctt taggcccgtt 1560
gtctgcaaattt ctttttatga ttttctatca aacaaaagag gaaaatagac cagttgcaat 1620
ccaaacgaga gtctaataaga atgaggcgtt aagtaaatc ggcgggttt gttactgata 1680
aaggcaggcaaa gacctaaaat gtgtaaaggg caaagtgtat actttggcgt cacccttac 1740
atatttttagg tctttttta ttgtcgtaa ctaacttgcctt atcttcaaacc agggggctg 1800
gaagaagcag accgctaaca cagtagataa aaaaggagac atgaacgatg aacatcaaaa 1860
agtttgcaaa acaagcaaca gtattaacct ttactaccgc actgctggca ggaggcgtt 1920
ctcaagcgtt tgcaaaagaa acgaacccaaa agccatataa ggaaacatac ggcattttccc 1980
atattacacg ccatgatatg ctgcaaattcc ctgaacagca aaaaaatgaa aaatatcaag 2040
tttctgaatt tgattcgtaa acaattaaaaa atatcttctt tgcaaaaggc ctggacgttt 2100
gggacagctg gccattacaa aacgctgacg gcaactgtcgc aaactatcac ggctaccaca 2160
tcgtctttgc attagccgga gatcctaaaaa atgcggatga cacatcgatt tacatgttct 2220
atcaaaaaagt cggcgaaact tctattgaca gctggaaaaaa cgctggccgc gtctttaaag 2280
acagcgacaa attcgatgca aatgattcta tcctaaaaga ccaaacacaa gaatggcag 2340
gttcagccac atttacatct gacggaaaaa tccgtttattt ctacactgat ttctccggta 2400
aacattacgg caaacaaaaca ctgacaactg cacaagttaa cgtatcagca tcagacagct 2460
ctttgaacat caacgggtgtt gaggattata aatcaatctt tgacggtgac ggaaaaacgt 2520
atcaaaaatgt acagcagttc atcgatgaag gcaactacag ctcaggcgc aaccatacgc 2580
tgagagatcc tcactacgtt gaagataaag gccacaaaata ctttgttattt gaagcaaaca 2640

ctggaactga agatggctac caaggcgaag aatctttatt taacaaagca tactatggca 2700
aagcacatc attcttcgtt caagaaagtc aaaaacttct gcaaagcgat aaaaaacgca 2760
cggtcgatggt agcaaacggc gctctcggtt tgattgagct aaacgatgtat tacacactga 2820
aaaaagtgtat gaaaccgctt attgcatacata acacagtaac agatgaaatt gaacgcgcga 2880
acgtcttaa aatgaacggc aaatggtacc tggttactga ctcccggtt tcaaaaaatga 2940
cgattgacgg cattacgtct aacgatattt acatgcttgg ttatgttctt aattcttaa 3000
ctggccata caagccgctt aacaaaactg gccttgggtt aaaaatggat cttgatccta 3060
acgatgttaac ctttacttac tcacacttgcg ctgtacactca agcgaaagga aacaatgtcg 3120
tgattacaag ctatatgaca aacagaggat tctacgcaga caaacaatca acgtttgcgc 3180
cgagcttcctt gctgaacatc aaaggcaaga aaacatctgt tgtcaaagac agcatccttgc 3240
aacaaggaca attaacagtt aacaaataaa aacgcaaaag aaaaatgccga tgggtaccga 3300
gcgaaatgac cgaccaagcg acgccccacc tgccatcacg agatttcgtat tccaccgcgc 3360
ccttcttatga aagggttgggc ttccgaatcg ttttccgggtt cgccctcgcg gacgtgctca 3420
tagtccacga cgcccggtat ttttagcccc tggccgtacgg ccagcaggta ggccgcacagg 3480
ctcatgccgg ccggccgcgc ctttcctca atcgctcttc gttcgcttgg aaggcagtac 3540
accttgatag gtgggctgcc cttccctgggtt ggcttgggtt catcagccat ccgttgcgc 3600
tcatctgtta cgccggcggtt agccggccag cctcgcagag caggattccc gttgagcacc 3660
gccaggtgcg aataaggac agtgaagaag gaacacccgc tcgcgggtgg gcctacttca 3720
cctatcctgc ccggctgacg ccgttggata caccaaggaa agtctacacg aaccctttgg 3780
caaaatcctg tatatcgatc gaaaaaggat ggatataccg aaaaatcgca tataatgacc 3840
ccgaaggcagg gttatgcacg gaaaaagcgcc tgcttccctg ctgtttgtt gaatatctac 3900
cgactggaaa caggcaaatg cagggaaatta ctgaactgag gggacaggcg agagacgtat 3960
ccaaagagct cctgaaaatc tcgataactc aaaaatacg cccggtagtg atcttatttc 4020
attatggtga aagttggAAC ctcttacgtt ccgtcaacg tctcattttc gccaaaagtt 4080
ggcccagggc ttcccggtat caacaggac accaggattt atttattctg cgaagtgtatc 4140
ttccgtcaca ggtatattt cggcgcaag tgcgtcggtt gatgctgcca acttactgtat 4200
tttgtatg atgggtttt tgaggtgttc cagtggttc tgtttctatc agtcctgaa 4260
aatctcgata actcaaaaaa tacgccccgtt agtgcatacata tttcattatg gtgaaagttt 4320
gaaccttta cgtgcccgtt aacgtctcat ttccggccaa agttggccca gggcttcccg 4380
gtatcaacag ggacaccagg atttattttat tctgcgaagt gatcttccgtt cacaggtatt 4440
tattcggcgc aaagtgcgtt ggggtgtatgtt gccaacttac tgatttagtg tatgatggtg 4500
tttttgggtt gctccagttt cttctgtttt tatcagggtt ggtatgtatc ccagcgcggg 4560

20

gatctcatgc tggagttctt cgcccacccccc aaaaggatct aggtgaagat ccttttgat 4620
 aatctcatga caaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta 4680
 gaaaagatca aaggatcttc tttagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa 4740
 aaaaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt tggttgcggg atcaagagct accaactctt 4800
 tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgttct tctagtgttag 4860
 ccgtagttag gccaccacctt caagaactct gttagcacccgc ctacataacctt cgctctgcta 4920
 atccgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtctg gtcttaccgg gttggactca 4980
 agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag 5040
 cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa 5100
 agcgccacgc ttcccgaaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgg 5160
 acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcctt ggtatcttta tagtcctgtc 5220
 gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga ttttgtgat gtcgtcagg ggggcggagc 5280
 ctatgyaaaa acgcccagcaa cgcggccttt ttacggttcc tggccttttgc tggcctttt 5340
 gctcacatgt tcttcctgc gttatcccctt gattctgtgg ataaccgtat taccgccttt 5400
 gagtgagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgtc agtgagcgg 5460
 gaagcggaaag agcggccaaat acgcaaaccg cctctcccccg cgcgttggcc gattcattaa, 5520
 tgcagctggc acgacagggtt tcccgactgg aaagcgggca gtgagcgtcaa cgcaattaat 5580
 gtgagtttagc tcactcatta ggcaccccaag gctttacact ttatgttcc ggctcgtatg 5640
 ttgtgtggaa ttgtgagcgg ataacaattt cacacaggaa acagctatga ccatgattac 5700
 gccaagcttg catgcctgca 5720

<210> 20

<211> 27

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<223> LYSC23

<400> 20

caccgcggct ttggacatca ctgctac

27

<210> 21

<211> 26

<212> DNA

<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>

<223> LYSC24

<400> 21

cctggggctt tagcggatgc gtctca

26

<210> 22
<211> 8324
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
<223> PK19

<220>
<221> misc_feature
<222> (2706)..(3968)
<223> lysC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3969)..(4166)
<223> Psod complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (4538)..(5236)
<223> 5' lysC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (5626)..(6420)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (6449)..(6911)
<223> PsacB

<220>
<221> misc_feature
<222> (6912)..(6)
<223> sacB

<40.0> 22
aaacgcaaaa gaaaatgccg atgggtaccg agcgaaaatga ccgaccaagc gacgccccaac 60
ctgccatcac gagatttcga ttccaccgccc gccttctatg aaagggttggg cttcggaaatc 120
gttttccggg acgcacctcgc ggacgtgctc atagtccacg acgcccgtga tttttagcc 180
ctggccgacg gccagcaggt aggccgacag gctcatgccg gccgccccgg cctttccctc 240
aatcgtctt cgttcgtctg gaaggcagta caccttgata ggtgggctgc ctttccttgtt 300
tggcttggtt tcatcagcca tccgccttgcc ctcatctgtt acgccccgg tagccggcca 360
gcctcgcaga gcaggattcc cggtgagcac cgccaggtgc gaataaggga cagtgaagaa 420
ggaacaccccg ctgcgggtg ggcctacttc acctatcctg cccggctgac gccgttggat 480
acaccaagga aagtctacac gaacccttg gcaaaatcct gtatatcgta cgaaaaagga 540
tggatataacc gaaaaaatcg ctataatgac cccgaagcag ggttatgcag cgaaaaagcg 600
ctgcttcct gctgtttgtt ggaatatcta ccgactggaa acaggcaaatt gcaggaaatt 660
actgaactga ggggacaggc gagagacgat gccaaagagc tcctgaaaat ctcgataact 720

caaaaaatac gcccggtagt gatcttattt cattatgggt aaagttggaa cctcttacgt 780
gccgatcaac gtctcattt cgccaaaagt tggcccaggg cttcccgta tcaacaggga 840
caccaggatt tatttattct gcgaagtgtat cttccgtcac aggtatttat tcggcgcaaa 900
gtgcgtcggg tgatgtgcc aacttactga tttagtgtat gatgggttt ttgaggtgct 960
ccagtggttt ctgtttctat cagctcctga aaatctcgat aactcaaaaa atacgcccgg 1020
tagtgatctt atttcattat ggtgaaagtt ggaacctt acgtgccat caacgtctca 1080
tttcgcca aagttggccc agggctccc ggtatcaaca gggacaccag gatttattta 1140
ttctgcgaag tgatcttccg tcacaggtat ttattcggcg caaagtgcgt cgggtgatgc 1200
tgccaaactta ctgatTTAGT gtatgtggt gttttgagg tgctccagtg gcttctgttt 1260
ctatcagggc tggatgatcc tccagcgcgg ggatctcatg ctggagttct tcgcccaccc 1320
caaaaggatc taggtgaaga tccttttga taatctcatg accaaaaatcc cttAACGTGA 1380
gttttgcgttc cactgagcgt cagacccgt agaaaaagatc aaaggatctt cttgagatcc 1440
ttttttctg cgcgtaatct gctgcttgca aacaaaaaaaa ccaccgctac cagcgggtgg 1500
ttgtttgcgc gatcaagagc taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc 1560
gcagatacca aatactgttc ttctagtgtt gccgtagttt ggccaccact tcaagaactc 1620
tgttagcaccg cctacatacc tcgctctgt aatcctgtt ccagtggctg ctgcccagtgg 1680
cgataagtgc tgtcttaccg ggttggactc aagacgatag ttaccggata aggccgcagcg 1740
gtcgggctga acgggggggtt cgtgcacaca gcccagctt gaggcaacga cctacacccga 1800
actgagatac ctacagcgtg agctatgaga aagcgccacg cttcccgaa ggagaaaggc 1860
ggacaggtat ccggtaagcg gcagggtcgg aacaggagag cgcacgaggg agcttccagg 1920
ggggaaacgcc tggtatcttt atagtcctgt cgggtttcgc cacctctgac ttgagcgtcg 1980
atttttgtga tgctcgatcg gggggcggag cctatggaaa aacgcgcagca acgcggcctt 2040
tttacggttc ctggcctttt gctggccttt tgctcacatg ttcttcctg cgttatcccc 2100
tgattctgtg gataaccgta ttaccgcctt tgagtgagct gataaccgctc gccgcagccg 2160
aacgaccgag cgcagcgtact cagtgagcga ggaagcggaa gagcgcaccaa tacgcaaacc 2220
gcctctcccc gcgcgttggc cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg 2280
gaaagcgggc agtgagcgcac acgcaattaa tgtgagttt ctcactcatt aggcacccca 2340
ggctttacac tttatgcttc cggctcgat gttgtgtggaa attgtgagcg gataacaatt 2400
tcacacagga aacagctatg accatgatta cgccaaagctt gcatgcctgc aggtcgactc 2460
tagaggatcc ccgggttaccg agctcgaatt cgccctttcg gttgcctgag taatgtcttc 2520
tacctcgatt tccgtgccac ggaattcaat cttacggcct gcggaaacgtg gggaaagcaaa 2580
gaaacgaaca gtgtcagctg gggaaattgcg ctcttccaaa aggggtgcgc taacctggcc 2640

gacctggccg gttgcaccaa caactgcgtat ggtggtcatt gtaaaactac tcctttaaaa 2700
cttagcgtc cggtgccgtc ataaaacgacg gttcgtctt cgccgcccag ctggactgc 2760
tcatgcaatg cacgtgcagc agcatccaga tcatcttac ggatcagcac gaaaaatacga 2820
atctcagagg tggaaatcaa ttgcgttac acgttgacat cgccagagc ttccatgaac 2880
tctcggtaa cacctgggtg agacttcatg ccagcaccca cgagggagac tttgccgacc 2940
tggtcgtcgtaa aaagcacatt ggtccagttg ccctgaacct gaagcttctt caagatctcc 3000
atcgccggc ggccgtcgga acgagggcag gtgaagatga tgcgttgtt gccgtttct 3060
acagaagaga cgttctgcag aaccatgtca atgttgattt ctgcacgc caacgcacgg 3120
aaaacccatcg cagcctcgcc tggcttatcg gaaataccca gaacggttac tttggcttcg 3180
gacttgcgg ttgcgacacc ggtaaggact gttttccca caggaatatac ctccatagag 3240
ccggcaatca aagtgcggg atcattacta taagacgagc gtacgcgaag tggcacattg 3300
aatgcacgag cgtattcaac actgcgcagc accaaaatct tggagccaac agcagcaagt 3360
tccagcattt ctgcgaagct gagctttcc agcttctgtg cattaggaac gatgcgcggg 3420
tcagcgttat acacaccgtc aacgtccgag taaatctcac acacatcagc gttcaaagca 3480
gctgccaacg caactgcagt ggtgtcagaa ccaccacgac ccaacgttgt gacatcgccg 3540
gtttcttat taacaccctg gaaaccagca acaatgcaga tcttgcctc atcgagtgt 3600
tcacgcacac gacctggagt gacatcaaca atgcgtgcgt ttccgtggcg ctcggtgtt 3660
agcacaccag cctgagagcc cgtgaaagat tggcttctg cgccaaaggga ctcaatagcc 3720
atggcgacga gagcgttaga aatacgctca ccagcagtca ggagcatatac catttcacga 3780
gctggcggaa cgggattcac tgccgctgca agttctagaa gttcatccgt ggtgtctccc 3840
attgcggagc agacaaccac gacatcattt ccagcattt tggtgcaac gatccgttca 3900
gcgacgttcc taatgcgttc cgcaactctca agcgaggaac cgccatattt ctgtacgacc 3960
aggccacgg gtaaaaaatc cttcgttagg tttccgcacc gagcatatac atctttgaa 4020
aatccgtcag atggcgcttc gcaaaagtac ttggtgcaac acctccaaat gataggcatt 4080
tttggata ttgcaacgaa attttcagc cgacctattt atcggttagc gggtcacaag 4140
cccgaaataa ttggcagcta agtagggttg aagggcataa ggcttcctca atttcgaaa 4200
ggaacattcc tggttatggca tggttttcg cacccgaacc cgtgttgtt accgctgtatg 4260
aggcgcttaa aggtggcagg catccgttt tagaaaatcc tgcgccgcaa gggcgaattc 4320
actggccgtc gtttacaac gtcgtgactg gaaaaaccct ggcgttaccc aacttaatcg 4380
ccttgcagca catccccctt tcgcccagctg gcgtaatagc gaagaggccc gcaccgatcg 4440
cccttcccaa cagttgcgca gcctgaatgg cgaatggcga taagctagat gcatgctcga 4500
gcggccgcca gtgtgtatgga tatctgcaga attcgccctt ggggctttag cggatgcgtc 4560

tcagccactg ggacgcgttc caataaacag accatatattt gatattcgat ttaatatttg 4620
agacaaaagt gacagggtct acttcgcgag caactcttta gtcaactacc ctgaatcaag 4680
tgcaaagcaa tctgctcgcc gtgcgtttcg ccctagcatc ggcattaaca atcgcatggg 4740
gcaccgtggc cagacaccgg atcgcgcgtcc gcaccccaaa agatggctcc ctaaggagct 4800
cacctttact caatgctctg atgacaccga tgtggtggc aggcatgagt accgcgtatgc 4860
tggcatattt cttacaaca gtagcacttg gtttcggcac cctcttggta gtgcaaccag 4920
tgcttgcct gtcgctgatg ttcacgctgc cgctctcagc acgattcaat ggctaccgac 4980
tacgccgaac taaaaatcttc tgggttaccc tcctcaccgt agccgtggc atcatgatcg 5040
ttttggacg ccccccttccc ggaaacccccc accccccactc gatcgatgga ttccagttact 5100
tttagtcggc gttgcagtaa tgggttggaaat gtggctgttt gcggaaatacg tattaaagaa 5160
ggacaaagcc ctcatccttgc gtcttgcgtt ggggttgcattt tttggctacg tagcgttgc 5220
gtccaaagcc gcggtaagg gcgaattcca gcacactggc ggccgttact agcttcacgc 5280
tgccgcaagc actcaggggcg caagggttgc taaaggaagc ggaacacgta gaaagccagt 5340
ccgcagaaac ggtgcgttgc accggatgttgc tttttttttt gggctatctg gacaagggaa 5400
aacgcaagcg caaagagaaa gcaggttagct tgcaatggc ttacatggcg atagcttagac 5460
tgggcgggtt tatggacagc aagcgaaccg gaattgcccag ctggggcgcc ctctggtaag 5520
gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaaggat ctgtatggcgc 5580
aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatctt ttcgcgtatgt tgaacaagat 5640
ggattgcacg caggttctcc ggccgttgg gtggagagggc tattcggcta tgactggca 5700
caacagacaa tcggctgttc tgatggccgc gtgttccggc tgtcagcgca gggcgcccc 5760
gttcttttttgc tcaagaccga cctgtccggc gcccgtatgt aactccaaga cgaggcagcg 5820
cggttatctgt ggctggccac gacggggcggtt ctttgcgttgc ctgtgttgcact 5880
gaagcgggaa gggactggct gctattggc gaagtggcg ggcaggatct cctgtcatct 5940
caccttgcgttgc tggccgagaa agtacccatc atggctgtatg caatgcggcg gctgcatacg 6000
cttgcgttgcgttgc ttttttttttgc attcgaccac caagcgaaac atcgcatcgatgc gcgagcacgt 6060
actcggatgg aagccggctt ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc 6120
gcccggccggcc aactgttgcgttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc 6180
gtgacccatg gcgatgccttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc 6240
tttgcgttgcact gtggccggctt ggggttggcg gaccgtatgttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc 6300
cgtgtatatttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc 6360
atcgccgcttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc 6420
gcggggactcttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc ttttttttttgc 6480

ttcactatta tttagtaaaa tgagatatta tgatatttc tgaattgtga taaaaaaggc 6540
aactttatgc ccatgcaaca gaaactataa aaaatacaga gaatggaaaag aaacagatag 6600
attttttagt tctttaggcc cgtagtctgc aaatccttt atgatttct atcaaacaaa 6660
agaggaaaat agaccaggta caatccaaac gagagtctaa tagaatgagg tcgaaaagta 6720
aatcgcgccg gtttgttact gataaagcag gcaagaccta aatgtgtaa agggcaaagt 6780
gtatactttg gcgtcacccc ttacatattt taggtcttt tttattgtgc gtaactaact 6840
tgccatcttc aaacaggagg gctggaagaa gcagaccgt aacacagtac ataaaaaagg 6900
agacatgaac gatgaacatc aaaaagttt caaaacaagc aacagtatta acctttacta 6960
ccgcactgct ggcaggaggc gcaactcaag cgtttgcgaa agaaacgaac caaaagccat 7020
ataagggaaac atacggcatt tcccatatta cacgcatga tatgctgcaa atccctgaac 7080
agcaaaaaaaaaa tgaaaaatat caagttcctg aatttgattc gtccacaatt aaaaatatct 7140
cttctgaaaa aggccctggac gtttggaca gctggccatt acaaaaacgct gacggcactg 7200
tcgcaaacta tcacggctac cacatcgctt ttgcatttagc cggagatcct aaaaatgcgg 7260
atgacacatc gatttacatg ttctatcaaa aagtccggcga aacttctatt gacagctgga 7320
aaaaacgctgg ccgcgtctt aaagacagcg acaaattcga tgcaaatgat tctatcctaa 7380
aagaccaaac acaagaatgg tcaggttcag ccacattac atctgacgga aaaatccgtt 7440
tattctacac tgatttctcc ggttaaacatt acggcaaaca aacactgaca actgcacaag 7500
ttaacgtatc agcatcagac agctcttga acatcaacgg tgttagaggat tataaatcaa 7560
tcttgacgg tgacggaaaa acgtatcaaa atgtacagca gttcatcgat gaaggcaact 7620
acagctcagg cgacaaccat acgctgagag atcctcacta cgtagaagat aaaggccaca 7680
aatacttagt atttgaagca aacactggaa ctgaagatgg ctaccaaggc gaagaatctt 7740
tatttaacaa agcatactat ggcaaaagca catcattctt ccgtcaagaa agtcaaaaac 7800
ttctgcaaag cgataaaaaa cgacggctg agttagcaaa cggcgctctc ggtatgattg 7860
agctaaacga tgattacaca ctgaaaaaag tgatgaaacc gctgattgca tctaacacag 7920
taacagatga aattgaacgc gcgaacgtct taaaaatgaa cggcaaatgg tacctgttca 7980
ctgactcccc cgatcaaaa atgacgattt acggcattac gtctaacgat atttacatgc 8040
ttggttatgt ttctaattct ttaactggcc catacaagcc gctgaacaaa actggccttg 8100
tgtaaaaat ggatcttgat cctaacgatg taaccttac ttactcacac ttcgctgtac 8160
ctcaagcgaa agggaaacaat gtcgtgatta caagctatat gacaaacaga ggattctacg 8220
cagacaaaca atcaacgttt gcggccgagct tcctgctgaa catcaaaggc aagaaaacat 8280
ctgttgc当地 agacagcatac cttgaacaag gacaattaac agtt 8324

<211> 52
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_23

<400> 23
cccgggatcc gctagcggcg cgccggccgg cccggtgtga aataccgcac ag 52

<210> 24
<211> 53
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_24

<400> 24
tctagactcg agcggccgcg gccggccttt aaattgaaga cgaaagggcc tcg 53

<210> 25
<211> 47
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_25

<400> 25
gagatctaga cccggggatc cgctagcggg ctgctaaagg aagcgga 47

<210> 26
<211> 38
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_26

<400> 26
gagaggcgcg ccgctagcgt gggcgaagaa ctccagca 38

<210> 27
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_27

<400> 27
gagagggcgg ccgcgc当地 tcccgttcg tgaa 34

<210> 28
<211> 34
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_28

<400> 28

gagaggcgccgg ccgctcaagt cggtaagcc acgc

34

<210> 29

<211> 140

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_29

<400> 29

tcgaatttaa atctcgagag gcctgacgtc gggcccggtt ccacgcgtca tatgactagt 60

tcggacccatggatatcgatc gacatcgatg ctcttctgcgtt ttaattaaca attgggatcc 120

tctagaccgg ggatttaaat

140

<210> 30

<211> 140

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> SEQ_ID_30

<400> 30

gatcatttaa atcccggttc tagaggatcc caattgttaa ttaacgcaga agagcatcga 60

tgtcgacgtatcccttaggtt ccgaactagt catatgacgcgtt accgttaccgg gcccgcgtc 120

aggcctctcg agatttaaat

140

<210> 31

<211> 5091

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> PCLIK5MCS

<220>

<221> misc_feature

<222> (469)..(1260)

<223> KanR

<220>

<221> misc_feature

<222> (1527)..(2387)

<223> Ori EC pMB (complement)

<220>

<221> misc_feature

<222> (2533)..(3207)

<223> Orf1

<220>

<221> misc_feature

<222> (3541)..(4662)
<223> Rep Protein

<400> 31
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtagc cacgcgtcat atgactagtt 60
cgAACCTAGG gatATCGTCG acATCGATGC tCTTCTGCGT taATTAAACAA ttGGGATCCT 120
ctAGACCCGG gATTTAAATC gCTAGCGGGC tgCTAAAGGA agCGGAACAC gTAGAAAGCC 180
agtCCGcaga aacggtgctg accccggatg aatgtcagct actggctat ctggacaagg 240
gaaaACGCAA gcGCAAAGAG aaAGCAGGTA gCTTGAGTG ggCTTACATG gcGATAgCTA 300
gACTGGGCGG ttTTATGGAC agCAAGCGAA ccGGAAATTGc cAGCTGGGC gcCCTCTGGT 360
aAGGTTGGGA agCCCTGCAA agTAAACTGG atGGCTTTCT tgCCGCCAAG gATCTGATGG 420
cgCAGGGGAT caAGATCTGA tCAAGAGACA ggATGAGGAT cgTTGCGAT gATTGAACAA 480
gATGGATTGc acGcAGGTTc tCCGGCCGCT tGGGTGGAGA ggCTATTGCG ctATGACTGG 540
gcACAACAGA caATCGGCTG ctCTGATGCC gcCGTGTtCC ggCTGTCAGC gcAGGGGCGC 600
ccGGTTCTTT ttGTCAAGAC cgACCTGTCC gGTGCCCTGA atGAACTGCA ggACGAGGCA 660
gcGCGGCTAT cGTGGCTGGC cacGACGGGC gTTCCttGCG cAGCTGTGCT cgACGTTGTC 720
actGAAGCGG gaAGGGACTG gCTGCTATTG ggcGAAGTGC cGGGGCAGGA tCTCCTGTCA 780
tCTCACCTTG ctCTGCCGA gAAAGTATCC atCATGGCTG atGCAATGCG gCGGCTGcat 840
acGCTTgATC cggCTACCTG cCCATTGAC cacCAAGCGA aACATGCGAT cgAGCGAGCA 900
cgtACTCGGA tGGAAGCCGG tCTTGTGAT cAGGATGATC tGGACGAAGA gCATCAGGG 960
ctCGCGCCAG ccGAACTGTT cgCCAGGCTC aAGGCGCGCA tgCCCACGG cgAGGATCTC 1020
gtCGTgACCC atGGCGATGC ctGCTTGCCT aATATCATGG tGGAAAATGG ccGCTTTCT 1080
ggATTCACTCG actGTGGCCG gCTGGGTGTG gCGGACCGCT atCAGGACAT agCGTTGGCT 1140
accCGTgATA ttGCTGAAGA gCTTGGCGC GAATGGCTG accGCTTCTC ctGTGCTTAC 1200
ggTATCGCCG ctCCCGATTc gcAGCGCATC gcCTTCTATC gcCTTCTGA cgAGTTCTC 1260
tgAGCGGGAC tCTGGGGTTC gAAATGACCG accAAGCGAC gCCCACCTG cCATCACGAG 1320
atTTGATTc caccGCCGCC ttCTATGAAA gTTGGGCTT cgGAATCGTT ttCCGGGACG 1380
ccGGCTGGAT gATCCTCCAG cgCGGGGATC tcATGCTGGA gTTCTCGCC cacGCTAGCG 1440
gcGCGCCGGC cggccccggtagc tgAAATAACCG cacAGATGCG taAGGAGAAA atACCgCATC 1500
aggCGCTTt ccGCTTCCtC gCTCACTGAC tcGCTGCGCT cggTCGTTG cGTGCGGCAG 1560
gcGGTATCAG cTCACTCAA ggcGGTAATA cgTTATCCA cAGAATCAGG ggATAACGCA 1620
ggAAAGAAACA tgtGAGCAA aggCCAGCAA aaggCCAGGA accGtaaaaaa ggCCGCGTTG 1680
ctGGCGTTT tCCATAGGCT ccGCCCCCCT gacGAGCATC acaaaaaATCG acGCTCAAGT 1740
cAGAGGTGGC gAAACCCGAC aggACTATAA agATACCAGG cgTTCCCCC tGGAAGCTCC 1800

ctcgtgcgct ctccctgttcc gaccctgccg cttaccggat acctgtccgc ctttctccct 1860
tcgggaagcg tggcgcttcc tcatacgctca cgctgttagt atctcagttc ggtgttaggtc 1920
gttcgcgtcca agctgggctg tgtgcacgaa ccccccgttc agccccgaccg ctgcgcctta 1980
tccggtaact atcgtcttga gtccaaacccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca 2040
gccactggta acaggattag cagagcgagg tatgttaggcg gtgctacaga gttcttgaag 2100
tggtggccta actacggcta cactagaagg acagtatttgc tcatctgcgc tctgctgaag 2160
ccagttacct tcggaaaaag agttggtagc tcttgatccg gcaaacaac acccgctgg 2220
agcgggtggtt tttttgttttcaagcagcattacgcgca gaaaaaaaaagg atctcaagaa 2280
gatcccttga tcttttctac ggggtctgac gctcagtggaa acgaaaactc acgttaaggg 2340
attttggtca tgagatttac aaaaaggatc ttcacctaga tcctttaaa ggccggccgc 2400
ggccgcgcaa agtcccgcctt cgtaaaaatt ttcgtgccgc gtgattttcc gccaaaaact 2460
ttaacgaacg ttgcgttataa tggtgtcatg accttcacga cgaagtacta aaattggccc 2520
gaatcatcag ctatggatct ctctgatgtc gcgctggagt ccgacgcgct cgatgctgcc 2580
gtcgattttaa aaacgggtat cggatttttc cgagctctcg atacgacgga cgccgcagca 2640
tcacgagact gggccagtgcc cgcgagcgcac cttagaaactc tcgtggcgga tcttgaggag 2700
ctggctgacg agctgcgtgc tcggccagcg ccaggaggac gcacagtagt ggaggatgca 2760
atcagttgcg cctactgcgg tggcctgatt cctccccggc ctgacccgcg aggacggcgc 2820
gaaaaatatt gctcagatgc gtgtcggtcc gcagccagcc gcgagcgcgc caacaaacgc 2880
cacgcccagg agctggagggc ggctaggtcg caaatggcgc tggaagtgcg tcccccgagc 2940
gaaattttgg ccatggtcgt cacagagctg gaagcggcag cgagaattat cgcgatcgt 3000
gcgggtccccg caggcatgac aaacatcgta aatgccgcgt ttctgtgtcc gtggccgccc 3060
aggacgtgtc agcgccgcac ccacccgcac cgaatcgca gcagcgtcg gcgtcgaaaa 3120
agcgcacagg cggcaagaag cgataagctg cacgaataacc tgaaaaatgt tgaacgcccc 3180
gtgagcggta actcacaggg cgtcggctaa ccccccagtcc aaacctggga gaaagcgctc 3240
aaaaatgact ctacggatt cacgagacat tgacacacccg gcctgaaat ttcccgctga 3300
tctgttcgac accccatccccg agctcgcgct gcgatcacgt ggctggacga gcaagacccg 3360
ccgcgaattc ctcgctcacc tgggcagaga aaatttccag ggcagcaaga cccgcgactt 3420
cgccagcgct tggatcaaag accccggacac ggagaaacac agccgaagtt ataccgagtt 3480
ggttcaaaat cgcttgcggc gtgccagttat gttctgtca cgcacgcgc gcacgcagcc 3540
gtgcttgcgc tggacattga tgtggcagac caccaggccg gcggggaaaat cgagcacgt 3600
aaccccgagg tctacgcgat tttggagcgc tgggcacgccc tgaaaaaagc gccagcttgg 3660
atcggcgtga atccactgag cggaaaaatgc cagctcatct ggctcattga tccgggttat 3720

gccgcagcag gcatgagcag cccgaatatg cgccctgctgg ctgcaacgac cgaggaaatg 3780
 acccgcttt tcggcgctga ccagcgcccc ttacatagac tgagccgtgg ccactgcact 3840
 ctccgacgat cccagccgta ccgctggcat gcccagcaca atcgctggta tcgcctagct 3900
 gatcttatgg aggttgctcg catgatctca ggcacagaaaa aacctaaaaa acgctatgag 3960
 caggagttt cttagcggacg ggcacgtatc gaagcggcaa gaaaagccac tgcggaaagca 4020
 aaagcacttg ccacgcttga agcaagcctg ccgagcgcgg ctgaagcgtc tggagagctg 4080
 atcgacggcg tccgtgtcct ctggactgct ccagggcgtg ccgcccgtga tgagacggct 4140
 tttcgccacg ctttgcgtgt gggataccag ttaaaaagcgg ctggtgagcg cctaaaaagac 4200
 accaagggtc atcgagccta cgagcgtgcc tacaccgtcg ctcaaggcggt cgaggaggc 4260
 cgtgagcctg atctggccgc ggactgtgac cgccagacgg attggccgcg acgtgtgcgc 4320
 ggctacgtcg ctaaaggcca gccagtcgtc cctgctcgatc agacagagac gcagagccag 4380
 ccgaggcga aagctctggc cactatggta agacgtggcg gtaaaaaggc cgcagaacgc 4440
 tggaaagacc caaacagtga gtacgcccga gcacagcggag aaaaactagc taagtccagt 4500
 caacgacaag ctaggaaatgc taaaggaaat cgcttgcacca ttgcagggtt gtttatgact 4560
 gttgagggag agactggctc gtggccgaca atcaatgaag ctatgtctga atttagcgtg 4620
 tcacgtcaga cctgtaatag agcacttaag gtctgcgggc attgaacttc cacgaggacg 4680
 ccgaaagctt cccagtaat gtgccatctc gttaggcagaa aacggtcccc ccgtagggtc 4740
 tctctcttgg cctcccttctt aggtcgggct gattgctttt gaagctctctt aggggggctc 4800
 acaccatagg cagataacgt tccccaccgg ctcgcctcgta aagcgcacaa ggactgctcc 4860
 caaaagatctt caaagccact gccgcgactg cttcgccgaa gccttgcggcc gcgaaattt 4920
 cttccaccga gttcgtgcac acccctatgc caagcttctt tcaccctaaa ttgcagagat 4980
 tggattctt ccgtggaaat tcttcgcaaa aatcgcccc tgatgcctt tgcgacgtt 5040
 gctcggtgc cgctgggtgc gcttggctt accgacttgc tcagcggccg c 5091

<210> 32
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
 <223> SEQ_ID_32

<400> 32
 gcgccgtacc tagactcacc ccagtgct

28

<210> 33
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_33

<400> 33
ctctactagt ttagatgttag aactcgatgt

30

<210> 34
<211> 6349
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PCLIK5MCS

<220>
<221> misc_feature
<222> (42)..(177)
<223> PmetA

<220>
<221> misc_feature
<222> (178)..(1311)
<223> metA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1727)..(2518)
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (2785)..(3645)
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (3791)..(4465)
<223> Ori-EC complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (4799)..(5920)
<223> Rep Protein

<400> 34
tcgatttaaa tctcgagagg cctgacgtcg ggcccggtac cttagactcac cccagtgc 60
aaagcgctgg gttttcttt ttcaagactcg tgagaatgca aactagacta gacagagctg 120
tccatataca ctggacgaag ttttagtctt gtccacccag aacaggcggt tattttcatg 180
cccaccctcg cgccttcagg tcaacttgaa atccaagcga tcggtgatgt ctccaccgaa 240
gccggagcaa tcattacaaa cgctgaaatc gcctatcacc gctggggtga ataccgcgta 300
gataaagaag gacgcagcaa tgtcggtctc atcgaacacg ccctcactgg agattccaac 360
gcagccgatt ggtgggctga cttgctcggt cccggcaaag ccatcaacac tgatatttac 420
tgcgtgatct gtaccaacgt catcggtggt tgcaacggtt ccaccggacc tggctccatg 480
catccagatg gaaatttctg gggtaatcgc ttccccgcca cgtccattcg tgatcaggta 540

aacggccaaa aacaattcct cgacgcactc ggcatcacca cggtcgccgc agtacttggt 600
ggttccatgg gtggtgcccc cacccctagag tgggcccaca tgtaccaga aactgttggc 660
gcagctgctg ttcttgcaagt ttctgcacgc gccagcgct ggcaaatcg cattcaatcc 720
gcccaaatta aggcgattga aaacgaccac cactggcacg aaggcaacta ctacgaatcc 780
ggctgcaacc cagccaccgg actcggcgcc gcccgcgc tcgcccacct cacctaccgt 840
ggcgaactag aaatcgacga acgcttcggc accaaagccc aaaagaacga aaacccactc 900
ggtccctacc gcaagcccga ccagcgcttc gccgtggaat cctacttgga ctaccaagca 960
gacaagctag tacagcggtt cgacgcccgc tcctacgtt tgctcaccga cgccctcaac 1020
cgccacgaca ttggtcgcga ccgccggaggc ctcaacaagg cactcgaatc catcaaagtt 1080
ccagtccttg tcgcaggcgt agataccgt attttgtacc cctaccacca gcaagaacac 1140
ctctccagaa acctggggaaa tctactggca atggcaaaaaa tcgtatcccc tgcggccac 1200
gatgctttcc tcaccgaaag ccccaatg gatcgcatcg tgaggaactt cttcagcctc 1260
atctccccag acgaagacaa cccttcgacc tacatcgagt tctacatcta aactagttcg 1320
gacctaggga tatcgctgac atcgatgctc ttctgcgtt attaacaatt gggatcctct 1380
agacccggga tttaaatcgc tagccggctg ctaaaggaag cggAACACGT agaaAGCCAG 1440
tcccgagaaa cgggtgctgac cccggatgaa tgcgtatctc tgggttatct ggacaaggga 1500
aaacgciaagc gcaaagagaa agcaggttagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga 1560
ctggccgggtt ttatggacag caagcgaacc ggaattgcca gctggggcgc cctctggtaa 1620
ggttgggaag ccctgcaaaag taaactggat ggctttcttgc cggccaaaggta tctgatggcg 1680
caggggatca agatctgatc aagagacagg atgaggatcg ttgcgtatgc ttgaacaaga 1740
tggattgcac gcagggttctc cggccgcttgc ggtggagagg ctattcgct atgactggc 1800
acaacagaca atcggctgct ctgatgcccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc agggggcggcc 1860
ggttttttt gtcaagacccg acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc 1920
gcggctatcg tggctggcca cggccggcgt tcctgcgcgc gctgtgctcg acgttgcac 1980
tgaagcggga agggactggc tgctattggg cgaagtggcc gggcaggatc tcctgtcattc 2040
tcaccttgc tctgcccaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac 2100
gcttgatccg gctacctgccc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcatcg agcgagcacc 2160
tactcgatg gaagccggc ttgtcgatca ggatgtatcg gacgaagagc atcaggggct 2220
cgcccccgc gaaactgttcg ccaggctaa ggccgcgcgc cccgacggcgc aggatctcg 2280
cgtgacccat ggcgatgcct gcttgcggaa tatcatgggtg gaaaatggcc gctttctgg 2340
attcatcgac tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac 2400
ccgtgatatt gctgaagagc ttggccggcga atgggctgac cgcttcctcg tgctttacgg 2460

tatcgccgct cccgattcgc agcgcatcgc cttcttatcgc cttcttgacg agttcttctg 2520
agcgggactc tggggttcga aatgaccgac caagcgacgc ccaacctgcc atcacgagat 2580
ttcgattcca ccggccgcctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgaaaaat ccgggacgccc 2640
ggctggatga tcctccagcg cgggatctc atgctggagt tcttcgcccc cgctagcggc 2700
gcgcggcccg gcccgggtgtg aaataccgca cagatgcgt aaggaaaaat accgcattcag 2760
gcgcctttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg gtcgttcggc tgccggcggc 2820
ggtatcagct cactcaaagg cgtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg 2880
aaagaacatg tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttgct 2940
ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca 3000
gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct 3060
cgtgcgtct cctgttccga ccctgcccgt taccggatac ctgtccgcct ttctcccttc 3120
gggaagcgtg ggcgtttctc atagctcacg ctgttaggtat ctcaaggcgg ttaggtcgt 3180
tcgcctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccggtcag cccgaccgct ggcgcattatc 3240
cggttaactat cgtctttagt ccaacccggta aagacacgcac ttatcgccac tggcagcaggc 3300
caactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt gctacagagt tcttgaagtg 3360
gtggcgttaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggat atctgcgtc tgctgaagcc 3420
atttaccccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag 3480
cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacggcgcaga aaaaaggat ctcaagaaga 3540
tccttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtgaaac gaaaactcac gttaaaggat 3600
tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg 3660
ccgcgc当地 tcccgcttcg tgaaaaatttt cgtgcgcgt gatccgc当地 caaaaacttt 3720
aacgaacgtt cggtataatg gtgtcatgac ctgcacgc当地 aagtactaaa attggccgc当地 3780
atcatcagct atggatctct ctgatgtcgc gctggagtcc gacgcgtcg atgctgcgt 3840
cgatttaaaa acggtgatcg gatccgc当地 agctctcgat acgacggacgc cggccagcatc 3900
acgagactgg gccagtgc当地 cgagcgaccc agaaactctc gtggcggatc ttgaggagct 3960
ggctgacgag ctgcgtgc当地 ggccagcgcc aggaggacgc acagtagtgg agatgcaat 4020
cagttgc当地 tactgc当地 ggctgattcc tccccc当地 gacccgc当地 gacggc当地 4080
aaaatattgc tcagatgc当地 gtcgtgc当地 agccagccgc gagcgc当地 acaaacgc当地 4140
cgccgaggag ctggaggcgg ctaggtcgca aatggcgctg gaagtgc当地 ccccgagcga 4200
aattttggcc atggtc当地 cagagctgga agcggcagcg agaattatcg cgatcg当地 4260
ggtgcccgca ggc当地 agacaa acatcgaaa tgccgc当地 cgtgtgc当地 ggccgccc当地 4320
gacgtgtcag cggccacc acctgc当地 accg aatcgacgc agcgtgc当地 gtc当地 4380

cgcacaggcg gcaagaagcg ataagctgca cgaatacctg aaaaatgtt aacgccccgt 4440
gagcggtAAC tcacagggcg tcggctaacc cccagtccaa acctgggaga aagcgctcaa 4500
aaatgactct agcggattca cgagacattg acacaccggc ctggaaattt tccgctgatc 4560
tgttcgacac ccattccgag ctcgcgtgc gatcacgtgg ctggacgagc gaagaccgccc 4620
gcgaattcct cgctcacctg ggcagagaaa atttccaggg cagcaagacc cgcgacttcg 4680
ccagcgcttg gatcaaagac cggacacgg agaaacacag cccgaagttat accgagttgg 4740
ttcaaaatcg cttgccccgt gccagtatgt tgctctgacg cacgcgcagc acgcagccgt 4800
gcttgtcctg gacattgatg tgccgagcca ccaggccggc gggaaaatcg agcacgtaaa 4860
ccccgaggc tacgcgattt tggagcgctg ggcacgcctg gaaaaagcgc cagcttggat 4920
cgcgctgaat ccactgagcg ggaaatgcc a gctcatctgg ctcattgatc cggtgttatgc 4980
cgcagcaggc atgagcagcc cgaatatgcg cctgctggct gcaacgaccg aggaaatgac 5040
ccgcgttttc ggcgctgacc aggcttttc acataggctg agccgtggcc actgcactct 5100
ccgacgatcc cagccgtacc gctggcatgc ccagcacaat cgcgtggatc gcctagctga 5160
tcttatggag gttgctcgca tgatctcagg cacagaaaaa cctaaaaaac gctatgagca 5220
ggagtttct agcggacggg cacgtatcga agcggcaaga aaagccactg cggaaagcaaa 5280
agcacttgcc acgcttgaag caaggctgcc gagcggccgt gaaagcgtctg gagagctgat 5340
cgacggcgtc cgtgtccctc ggactgctcc agggcgtgcc gcccgtgatg agacggcttt 5400
tcgcccacgct ttgactgtgg gataccagtt aaaagcggct ggtgagcgc taaaagacac 5460
caagggtcat cgagcctacg agcgtgccta caccgtcgct caggcggctg gaggaggccg 5520
tgagcctgat ctgccgcccgg actgtgaccg ccagacggat tggccgcgac gtgtgcgcgg 5580
ctacgtcgct aaaggccagc cagtcgtccc tgctcgctcag acagagacgc agagccagcc 5640
gaggcggaaaaa gctctggcca ctatggaaag acgtggcggt aaaaaggccg cagaacgctg 5700
gaaagaccca aacagtgagt acgcccggc acagcgagaa aaactagcta agtccagtca 5760
acgacaagct aggaaagcta aaggaaatcg cttgaccatt gcaggttgggt ttatgactgt 5820
tgagggagag actggctcggt ggccgacaat caatgaagct atgtctgaat ttagcgtgtc 5880
acgtcagaccc gtgaatagag cacttaaggt ctgcgggcat tgaacttcca cgaggacgcc 5940
gaaagcttcc cagtaaatgt gccatctcggt aggccggaaaaa cggttcccccc gtagggtctc 6000
tctcttggcc tccttcttag gtcgggctga ttgcttgcgat agctctcttag gggggctcac 6060
accataggca gataacgttc cccaccggct cgcctcgtaa ggcacaaagg actgctccca 6120
aagatcttca aagccactgc cgcgactgcc ttgcgcgaagc cttgccccgc gggaaatttcc 6180
tccaccggagt tcgtgcacac ccctatgcca agcttcttcc accctaaattt ccagagattg 6240
gattcttacc gtggaaatttcc ttgcggaaaaa tcgtccccgt atgcggcttg .cgacgttggc 6300

gtcggtgccg ctggttgcgc ttggcttgcac cgacttgatc agcgccgc 6349

<210> 35
<211> 29
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_35

<400> 35
gagactcgag agctgccaat tattccggg

29

<210> 36
<211> 41
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_36

<400> 36
cctgaaggcg cgagggtggg catggtaaa aaatccttc g

41

<210> 37
<211> 19
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_37

<400> 37
cccaccctcg cgccttcag

19

<210> 38
<211> 18
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> SEQ_ID_38

<400> 38
ctgggtacat tgcggccc

18

<210> 39
<211> 6386
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> PCLIK5MCS

<220>
<221> misc_feature
<222> (6)..(196)
<223> Psod

```
<220>
<221> misc_feature
<222> (197 )..(1330 )
<223> metA

<220>
<221> misc_feature
<222> (1752 )..(2543 )
<223> KanR

<220>
<221> misc_feature
<222> (2810 )..(3670 )
<223> Ori-Ec (pMB) complement

<220>
<221> misc_feature
<222> (3816 )..(4490 )
<223> Orf1

<220>
<221> misc_feature
<222> (4824 )..(5945 )
<223> Rep Protein

<400> 39
tcgagagctg ccaatttttc cgggcttgtg acccgctacc cgataaaatag gtcggctgaa 60
aaatttcgtt gcaatatcaa caaaaaggcc tatcattggg aggtgtcgca ccaagtactt 120
ttgcgaagcg ccatctgacg gatttcaaa agatgtatat gctcggtgcg gaaacctacg 180
aaaggatttt ttacccatgc ccaccctcgc gccttcaggt caacttgaaa tccaagcgat 240
cggtgatgtc tccaccgaag ccggagcaat cattacaac gctgaaatcg cctatcaccc 300
ctggggtgaa taccgcgtag ataaagaagg acgcagcaat gtcgttctca tcgaacacgc 360
cctcactgga gattccaacg cagccgattg gtgggctgac ttgctcggtc cccgcaaagc 420
catcaacact gatatttact gcgtgatctg taccaacgtc atcggtggtt gcaacggttc 480
caccggacct ggctccatgc atccagatgg aaatttctgg ggtaatcgct tccccgccac 540
gtccattcgt gatcaggtaa acgcccggaaa acaattcctc gacgcactcg gcatcaccac 600
ggtcgcccga gtacttggcg gttccatggg tggtgcccgcc accctagagt gggccgcaat 660
gtacccagaa actgttggcg cagctgctgt tcttgcagtt tctgcacgcg ccagcgcctg 720
gcaaatcgac attcaatccg cccaaattaa ggcgattgaa aacgaccacc actggcacga 780
aggcaactac tacgaatccg gctgcaaccc agccacccgga ctcggcgccg cccgacgcac 840
cgccccaccc acctaccgtg gcgaactaga aatcgacgaa cgcttcggca ccaaagccca 900
aaagaacgaa aacccactcg gtccttaccg caagccccgac cagcgcttcg ccgtggaatc 960
ctacttggac taccaagcgac acaagctagt acagcgtttc gacgcggct cctacgtctt 1020
gctcaccgac gccctcaacc gccacgacat tggtcgcgac cgcggaggcc tcaacaaggc 1080
actcgaatcc atcaaagtcc cagtccttgt cgcaggcgta gataccgata ttttgtaccc 1140
```

ctaccaccag caagaacacc tctccagaaa cctggaaat ctactggcaa tggcaaaaat 1200
cgtatcccct gtcggccacg atgctttctt caccgaaagc cgccaaatgg atcgcatgt 1260
gaggaacttc tttagcctca tctccccaga cgaagacaac ccttcgacct acatcgagtt 1320
ctacatctaa catatgacta gttcggacct agggatatcg tcgacatcga tgctcttctg 1380
cgtaattaa caattggat cctctagacc cggtttaaa atcgctagcg ggctgctaaa 1440
ggaagcggaa cacgtagaaa gccagtccgc agaaacggtg ctgaccccg atgaatgtca 1500
gctactggc tatctggaca agggaaaacg caagcgcaa gagaaagcag gtagcttgca 1560
tgcccccttac atggcgatag cttagactggg cggtttatg gacagcaagc gaaccggaaat 1620
tgccagctgg ggcgcctct ggtaagggtt ggaagccctg caaatggaaac tggatggctt 1680
tcttgcgc aaggatctga tggcgcaggg gatcaagatc tgatcaagag acaggatgag 1740
gatcgttcg catgattgaa caagatggat tgcacgcagg ttctccggcc gcttgggtgg 1800
agaggctatt cggttatgac tgggcacaac agacaatcgg ctgctctgat gcccgggtgt 1860
tccggctgtc agcgcagggg cgcccggttc ttttgtcaa gaccgacctg tccgggtgcc 1920
tgaatgaact gcaggacgag gcagcgccgc tatcggttgc ggcacgacg ggcttcctt 1980
gcgcagctgt gctcgacgtt gtcactgaag cgggaaggga ctggctgcta ttggcgaag 2040
tgccggggca ggatctccctg tcatctcacc ttgctctgc cgagaaagta tccatcatgg 2100
ctgatgcaat gcccggctg catacgctt atccggctac ctgcccattc gaccaccaag 2160
cgaaacatcg catcgagcga gcacgtactc ggatggaagc cggcttgc gatcaggatg 2220
atctggacga agagcatcag gggctcgccgc cagccgaact gttcggcagg ctcaaggcgc 2280
gcatgcccga cggcgaggat ctctgtcgtga cccatggcga tgcctgctt ccgaatatca 2340
tggggaaaaa tggccgcttt tctggattca tcgactgtgg ccggctgggt gtggcggacc 2400
gctatcagga catagcggtt gctacccgtt atattgtga agagcttggc ggcgaatggg 2460
ctgaccgctt cctcggtt tacggtatcg ccgtcccgta ttgcacgcgc atcgcttct 2520
atcgcttct tgcgtgttcc ttctgagcgg gactctgggg ttgcggatgtt ccgaccaagc 2580
gacgcccac ctgcacatcac gagattcga ttccaccgccc gccttctatg aaagggttggg 2640
tttcggaaatc gtttccggg acgcccgtt gatgtatcg cagcgcgggg atctcatgt 2700
ggagttcttc gcccacgcta gcggcgcgcg ggccggcccg gtgtgaaata ccgcacagat 2760
gcgttaaggag aaaataccgc atcaggcgctt cttccgttcc ctgcgtcact gactcgctgc 2820
gctcggtgt tcggctgcgg cgagcggat cagctcactc aaaggcgta atacggat 2880
ccacagaatc agggataac gcagggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 2940
ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgcgtggcgt tttccatag gctccggccc cctgacgagc 3000
atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc 3060

aggcgttcc ccctggaagc tccotcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccc 3120
gataacctgtc cgcccttctc ccttcggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 3180
ggtatctcag ttccggtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccc 3240
ttcagccccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgct tgagtccaaac ccggtaagac 3300
acgacttatac gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 3360
ccggtgctac agagttttg aagtggggc ctaactacgg ctacactaga aggacagtat 3420
tttgtatctg cgctctgctg aagccagttt ctttcggaaa aagagttggt agctttgtat 3480
ccggcaaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 3540
gcagaaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatctttc tacgggtct gacgctcagt 3600
ggaacgaaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcaccc 3660
agatcctttt aaaggccggc cgccggccgc caaagtcccg cttcgtgaaa attttcgtgc 3720
cgcgtgatTT tccgccaAAA actttaacga acgttcgtta taatgggtgc atgaccttca 3780
cgacgaagta ctAAAATTGG cccgaatcat cagctatgga tctctctgtat gtcgcgctgg 3840
agtccgacgc gctcgatgt gccgtcgatt taaaaacggt gatcgattttt ttccgagctc 3900
tcgatacgac ggacgcgcca gcatcacgag actggggccag tgccgcgagc gacctagaaaa 3960
ctctcgtggc ggatcttgag gagctggctg acgagctgcg tgctcggcca gGCCAGGAG 4020
gacgcacagt agtggaggat gcaatcagtt ggcctactg cgggtgcattt attcctcccc 4080
ggcctgaccc gcgaggacgg cgccaaatattt attgctcaga tgctgtcgt gccgcagcca 4140
gcccgcagcg cgccaaacaaa cgccacgccc aggagctgga ggcggctagg tcgcaaattgg 4200
cgcttggaaatg gctcccccgg agcggaaattt tggccatggt cgtcacagag ctggaaagcgg 4260
cagcgagaat tatcgcgatc gtggcggtgc ccgcaggcat gacaaacatc gtaaatgcgg 4320
cgtttctgtt gccgtggcccg cccaggacgt gtcagcgcgg ccaccacctg caccgaatcg 4380
gcagcagcgt cgccgcgtcga aaaagcgcac aggccggcaag aagcgataag ctgcacgaat 4440
acctgaaaaaa tggtaacgc cccgtgagcg gtaactcaca gggcgtcggc taaccccccag 4500
tccaaacctg ggagaaagcg ctcaaaaatg actctagcgg attcacgaga cattgacaca 4560
ccggcctgga aattttccgc tgatctgttc gacacccatc ccgagctcgc gctgcgatca 4620
cgtggctgga cgagcgaaga ccgcccggaa ttccctcgctc acctggcag agaaaaatttc 4680
cagggcagca agacccgcga ctccgcgc gcttggatca aagacccggaa cacggagaaaa 4740
cacagccgaa gttataccga gttggttcaa aatcgcttgc ccgggtgccag tatgttgctc 4800
tgacgcacgc gcagcagca gccgtgcgg tccctggacat tgatgtcggc agccaccagg 4860
ccggcgggaa aatcgagcac gtaaaccggc aggtctacgc gatTTGGAG cgctggcacc 4920
gcctggaaaa agcgcagct tggatcggcg tgaatccact gagcgggaaaa tgccagctca 4980

tctggctcat tgatccggtg tatgccgcag caggcatgag cagcccgaat atgcgcctgc 5040
 tggctcaac gaccgaggaa atgacccgcg ttttcggcgc tgaccaggct ttttcacata 5100
 ggctgagccg tggccactgc actctccgac gatcccagcc gtaccgctgg catgcccagc 5160
 acaatcgctgt ggatcgctta gctgatctta tggaggttgc tcgcatgatc tcagggcacag 5220
 aaaaaccta aaaaacgtat gagcaggagt tttctagcgg acgggcacgt atcgaagcgg 5280
 caagaaaaagc cactgcgaa gcaaaagcac ttgccacgct tgaagcaagc ctgccgagcg 5340
 ccgctgaagc gtctggagag ctgatcgacg gcgtccgtgt cctctggact gctccaggc 5400
 gtgccgccccg tgatgagacg gctttcgcc acgctttgac tgtggatac cagttaaaag 5460
 cggctggta ggcgcctaaaa gacaccaagg gtcatcgagc ctacgagcgt gcctacaccg 5520
 tcgctcaggc ggtcggagga ggccgtgagc ctgatctgcc gccggactgt gaccgccaga 5580
 cggttggcc ggcacgtgtg cgcggctacg tcgctaaagg ccagccagtc gtccctgctc 5640
 gtcagacaga gacgcagagc cagccgaggc gaaaagctct ggccactatg ggaagacgtg 5700
 gcggtaaaaaa ggccgcagaa cgctggaaag acccaaacag tgagtacgcc cgagcacagc 5760
 gagaaaaaact agctaagtcc agtcaacgc aagcttaggaa agctaaagga aatcgcttga 5820
 ccattgcagg ttggtttatg actgttggagg gagagactgg ctcgtggccg acaatcaatg 5880
 aagctatgtc tgaatttacg gtgtcacgtc agaccgtgaa tagagcacjt aaggctcg 5940
 ggcattgaac ttccacgagg acgcccggaaag cttcccgatg aatgtgccat ctcgtaggca 6000
 gaaaaacggtt ccccccgtagg gtctctctt tggcctccctt tctaggtcg gctgattgct 6060
 cttgaagctc tctagggggg ctcacaccat aggcagataa cgttccccac cggctcgcc 6120
 cgtaagcgca caaggactgc tcccaaagat cttcaaagcc actgcccggcga ctgccttcgc 6180
 gaagcccttgc cccgcggaaa tttccctccac cgagttcgtg cacaccctta tgccaagctt 6240
 ctttcaccct aaattcgaga gattggattc ttaccgtgaa aattcttcgc aaaaatcg 6300
 ccctgatcgc ctttgcgacg ttggcgtcgg tgccgctggg tgcgcttggc ttgaccgact 6360
 tgatcagcgg ccgctcgatt taaatc 6386

<210> 40
<211> 1005
<212> DNA
<213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
<223> FRUCTOSE-1,6-BISPHOSPHATASE

<400> 40
atgaaccta .agaacccga aacgccagac cgtaaccttg ctatggagct ggtgcgagtt 60
acggaaggcag ctgcactggc ttctggacgt tgggttggac gtggcatgaa gaatgaaggc 120
gacggtgccg ctgttgcacgc catgcgccag ctcatcaact cagtgaccat gaagggcg 180

40

gttgttatcg gcgagggcga aaaagacgaa gctccaatgc tgtacaacgg cgaagaggc 240
 ggaaccggct ttggacctga ggttgatate gcagttgacc cagttgacgg caccaccctg 300
 atggctgagg gtcgccccaa cgcaatttcc attctcgacag ctgcagagcg tggcaccatg 360
 tacgatccat cctccgtctt ctacatgaag aagatgcgg tgggacctga ggccgcaggc 420
 aagatcgaca tcgaagctcc agttgcccac aacatcaacg cggtggcaaa gtccaaggga 480
 atcaaccctt ccgacgtcac cggtgtcggt cttgaccgtc ctgcacat cgaactgatc 540
 gcagacattc gtcgtgcagg cgcaaagggtt cgtctcatct ccgacggcga cggtgcaggt 600
 cgagttgcag cagtcagga ttccaaactcc gtggacatca tgatggcac cggcggacc 660
 ccagaaggca tcatactgc gtgcgccatg aagtgcattt gttggcaat ccagggcattc 720
 ctggcccaa tgaacgattt cgagcgccag aaggcacacg acgcttgtt gtttttgat 780
 caggttctgc acaccaacga tctggtgagc tccgacaact gctacttcgt ggcaaccgg 840
 gtgaccaacg gtgacatgtt ccgtggcggtt tcctaccgcg caaacggcgc aaccacccgt 900
 tccctggta tgcgcgcaaa gtcaggcacc atccgcaca tcgagtctgt ccaccagctg 960
 tccaagctgc aggaataactc cgtggttgac tacaccacccg cgacc 1005

<210> 41

<211> 335

<212> PRT

<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 41

Met	Asn	Leu	Lys	Asn	Pro	Glu	Thr	Pro	Asp	Arg	Asn	Leu	Ala	Met	Glu
1														15	

Leu	Val	Arg	Val	Thr	Glu	Ala	Ala	Ala	Leu	Ala	Ser	Gly	Arg	Trp	Val
														30	
20															

Gly	Arg	Gly	Met	Lys	Asn	Glu	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Val	Asp	Ala	Met
35														45	

Arg	Gln	Leu	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Met	Lys	Gly	Val	Val	Val	Ile	Gly
50														60	

Glu	Gly	Glu	Lys	Asp	Glu	Ala	Pro	Met	Leu	Tyr	Asn	Gly	Glu	Glu	Val
65														80	

Gly	Thr	Gly	Phe	Gly	Pro	Glu	Val	Asp	Ile	Ala	Val	Asp	Pro	Val	Asp
85														95	

Gly	Thr	Thr	Leu	Met	Ala	Glu	Gly	Arg	Pro	Asn	Ala	Ile	Ser	Ile	Leu
100														110	

Ala	Ala	Ala	Glu	Arg	Gly	Thr	Met	Tyr	Asp	Pro	Ser	Ser	Val	Phe	Tyr
115														125	

Met	Lys	Lys	Ile	Ala	Val	Gly	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Lys	Ile	Asp	Ile
130														140	

Glu	Ala	Pro	Val	Ala	His	Asn	Ile	Asn	Ala	Val	Ala	Lys	Ser	Lys	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

145	150	155	160
Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val Leu Asp Arg Pro Arg His			
165		170	175
Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala Gly Ala Lys Val Arg Leu			
180	185		190
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val Ala Ala Gln Asp Ser			
195	200	205	
Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly Gly Thr Pro Glu Gly Ile			
210	215	220	
Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly Gly Glu Ile Gln Gly Ile			
225	230	235	240
Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln Lys Ala His Asp Ala Gly			
245		250	255
Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn Asp Leu Val Ser Ser Asp			
260	265		270
Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr Asn Gly Asp Met Leu Arg			
275	280	285	
Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr Thr Arg Ser Leu Val Met			
290	295	300	
Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile Glu Ser Val His Gln Leu			
305	310	315	320
Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp Tyr Thr Thr Ala Thr			
325		330	335

<210> 42
<211> 6
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> POTENTIELLE_-10-REGION_1

<400> 42
tgcaat

6

<210> 43
<211> 7
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<223> POTENTIELLE_-10-REGION_2

<400> 43
tatcatt

7

<210> 44
<211> 7
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<223> RIBOSOMALE BINDUNGSSTELLE\SHINE-DALGARNO

<400> 44

gaaagga